

FENİLALANİN, TRİPTOFAN ve TİROZİN AMİNOASİTLERİNİN
UV/VIS-TÜREV SPEKTROFOTOMETRESİ İLE BAZI BİYOKİMYASAL
ÖRNEKLERDE İNCELENMELERİ

Yüksel Özdemir

inönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve
Yönergesinin

Kimya Anabilim Dalı için öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

OCAK-1988

MALATYA

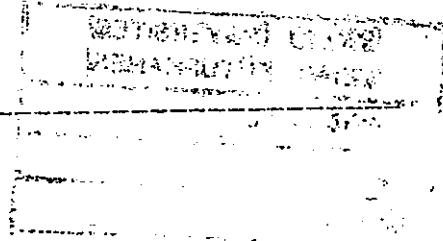
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

İş bu çalışma, jürimiz tarafından KİMYA
Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Başkan: _____

Üye : _____

Üye : _____



ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu
onaylıyorum

...../...../1988

Enstitü Müdürü

"Nişanlım Zeynep ÖZTÜRK'e"

*

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın başından itibaren her zaman yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, beni bu çalışmaya yönlendiren Sayın hocam Prof.Dr. Seref GÜÇER'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yazılma aşamasında eksiklerimi tamamlayarak; bana her türlü olanaklarını esirgemeyen ve teşviklerinden yararlandığım Sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Mustafa DEMİR'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm analitik kimya grubundaki arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

TEŞEKKÜR	V
TABLolar	VII
SEKİLLER	VIII
I. GİRİŞ	1
II. TEORİK KISIM	4
2.1 Klasik Yöntemlerle Aminoasit Analizleri	4
2.1.1 Spektrofotometrik Olarak Aminoasit Analizleri	4
2.1.2 Kromatoğrafik Olarak Aminoasit Analizleri	5
2.2 UV/VIS Bölgede Soğurma	8
2.2.1 Lambert-Beer Yasası	10
2.2.2 Lambert-Beer Yasasından Gözlenen Sapmalar	13
2.2.3 Işınımın Organik Maddeler Tarafından Soğurumu	14
2.2.4 Işınımın Anorganik Türler Tarafından Soğurumu	15
2.2.5 UV/VIS Spektrofotometresinde Kalitatif ve Kantitatif Analiz	17
2.2.6 Proteinlerin UV/VIS Bölgede Soğurumları	20
2.3 UV/VIS Türev Spektrofotometresi	21
2.3.1 Türevin Açıklanması	24
2.3.2 Analitik Bandların Türevleri	26
2.3.3 Türev Spektrofotometresinde Kalitatif ve Kantitatif Analiz	31
2.3.4 Türev Spektrofotometresinin Uygulamaları	34
2.4 Yemdeki Protein Kaynakları ve Proteinlerin Saflaştırıl ması	36

III. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	37
3.1 Materyal ve Metod	37
3.1.2 Stok Aminoasit Çözeltilerinin Hazırlanması	38
3.1.3 Sabit pH daki Çözeltilerinin Hazırlanması	39
3.1.4 Standart Aminoasit Çözeltilerinin Hazırlanması	39
3.1.5 Kullanılan Diğer Çözeltilerin Hazırlanması	40
3.2 Deneysel işlemler	40
3.3 Yemde Bulunan Protein Sınıflarının Elde Edilmesi	42
IV. TARTIŞMA	43
4.1 Aromatik Aminoasitlerin Temel ve Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi	43
4.2 Aromatik Aminoasit Karışımlarının Analizi	46
4.3 Yem Proteinlerindeki Aminoasit PİKlerinin Belirlenmesi	47
4.4 Aminoasitlerin Kalibrasyon ve Çalışma Grafiklerinin Çizimleri	49
4.6 Yem Proteinlerindeki Aminoasit Miktarları	53
V. SONUÇ	53
ÖZET	53
SUMMARY	53
KAYNAKLAR	60

*

TABLOLAR

2.3.2 Türev Spektroskopisinin Uygulamaları	35
2.4.1 Çözünürlüklerine Göre Protein Sınıfları	37
3.2.1 İşlem Basamağı	41
3.3.1 10gr Yemdeki Protein Sınıflarının Miktarları	42
4.5.1 Standart Aminoasit Çözeltilerinin Parametreleri	53
4.5.2 10gr Yemde Denatüre Edilmiş Proteinlerdeki	54
Aminoasit Miktarları	
4.5.3 100gr Yemdeki Aminoasit Miktarları	54

SEKILLER

2.2.1	Absorpsiyon Spektrumları.....	9
2.2.1.1	Soğurma Hücresi	10
2.3.2.1	Analitik Bandların Türevleri	29
2.3.3.1	Türev spektrumlarının değerlendirilmesi	33
3.1.2	Elektronik Türev Alıcı Devre	38
4.1.1	Aminoasitlerin Temel Spektrumları	43
4.1.2	Phe'nin temel ve 2. türev Spektrumu	44
4.1.3	Trp'nin temel ve 2. türev Spektrumu	45
4.1.4	Tyr'nin temel ve 2. türev Spektrumu	45
4.2.1	Aminoasit Karışımlarının Temel ve türev Spektrumları .	46
4.3.1	8 M Ürede Denatüre edilmiş Proteinin Temel	48
	Spektrumu	
4.3.2	8 M Ürede Denatüre edilmiş Proteinin 2.türev	48
	Spektrumu	
4.4.1	Phe Standartlarının 2. türev Spektrumları	50
4.4.2	Phe'nin Kalibrasyon ve çalışma Grafiği	50
4.4.3	Trp Standartlarının 2. türev Spektrumları	51
4.5.4	Trp'nin Kalibrasyon ve çalışma Grafiği	51
4.4.5	Tyr Standartlarının 2.türev Spektrumları	52
4.4.6	Tyr'nin Kalibrasyon ve çalışma Grafiği	52

I. G i R i Ő

Proteinler, canlı organizmanın çok önemli bir parçasını teşkil ederler. Proteinler, hayat için son derece gerekli organik bileşiklerdir. Canlılığın başlıca özelliklerinden olan; büyüme, çoğalma ve kendi kendini onarma süreçleri protein ve proteinlerden meydana gelen bileşiklerle yakından ilgilidir. Hayat için son derece gerekli olan proteinleri amino asitler oluşturmaktadır. Doğal olarak meydana gelen proteinlerin yapısında yirmi amino asitin, değişik sayı ve şekillerde sıralanması sonucu protein ve protein türleri meydana gelir.

Proteinlerin yapısında yer alan bu aminoasitlerden 10'nu (arjinin, histidin, izolösin, lösin, lizin, methonin, fenilalanin, thronin, triptofan ve valin) temel aminoasitler, diğer 10'u ise (alanin, asparajin, aspartik asit, sistein, glutamik asit, glutamin, glisin, prolin, serin ve tirozin) temel olmayan aminoasitler olarak sınıflandırılmaktadır. Temel aminoasitler, organizma tarafından sentezlenemediğinden mutlaka dışarıdan alınması gerekmektedir (Emil.L.Smith vd 1983).

Proteinlerin sindirimi genel olarak midede başlar. Burada mide asidi ve pepsin, oniki parmak barsağından salgılanan tripsin ve kimotripsin enzimlerinin yardımıyla protein molekülleri, polipeptidlere ve aminoasitlere parçalanırlar. Polipeptidler, pankreasın karboksipeptidaz ve ince barsakta amino ve tripeptidaz enzimlerinin etkisiyle aminoasitlere kadar hidroliz olmaktadır.

*

Bu yolla ayrılan aminoasitler ince barsaktan kolaylıkla absorbe olarak kana karışmaktadırlar. Kana karışan aminoasitler, alyuvarlarda intra ve ekstrasellüler sıvıda serbest olarak depolanırlar. Organizmada serbest halde depolanan aminoasitler, çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Serbest aminoasitler; doku ve kan proteinlerinin, hormonlar ve enzimlerin yapımında temel yapı taşlarını meydana getirmelerinin yanında, protein olmayan fakat azot içeren ve organizmanın biyolojik işlevlerinde önemli rol oynayan: nükleik asitler, purinler, primidinler, keratin ve hormonların yapımında görev yapmaktadırlar. Ayrıca, üre ve amonyağın sentezinde, organizmanın enerji gereksinimini sağlayıcı lipid ve karbohidratların yapımında, transaminasyon yolu ile temin olmayan aminoasitlerin sentez edilmesinde önemli rol oynamaktadır (Leninger.A.L. 1970).

Biyolojik açıdan önemli olan amino asitlerin belirlenmesi, canlının büyümesi ve gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Klasik olarak amino asit analizleri kromatografik ve spektrofotometrik olarak yapılmaktadır. Bu tekniklerin temel ilkeleri ve uygulama prensipleri ileriki bölümde detaylı olarak açıklanmaya çalışılmaktadır.

Proteinlerin; elektromagnetik spektrumun Ultraviyole bölgesinde soğurum yapması, protein yapısında yer alan Fenilalanin(Phe), Triptofan (Trp) ve Tirozin(Tyr) amino asitlerinden ileri gelmektedir. Protein yapısında yer alandığı bir amino asit olan Sisteinin ise bu bölgede

*

soğurma özelliği çok zayıftır.

Bu üç amino asitin 200-300 nm arasında aktif bir şekilde absorplanmalarından dolayı spektrumlar üst üste çakışmış olarak belirlenmektedir, bu nedenle üst üste çakışan bu spektrumları Türev Spektrofotometresi ile birbirinden ayırdetmek mümkün olabilmektedir.

Türev Spektrofotometresinin ilkeleri 1950' li yıllarda HAMMON ve PRICE ile TANNENBAUR ve MORRISON adlı bilim adamları tarafından ileri sürülmesinden sonra bir çok analitik tekniklere uygulanabilecek alana sahip olmuştur. Fakat diğer tekniklere nazaran daha çok UV/VIS alanında görülmesi, bu bölgede üst üste gelen spektrumların daha sık görülmesinden kaynaklanmaktadır.

Türev Spektrofotometresi yayvan maksimumları daha iyi belirleme imkanı vermekte, aynı zamanda zayıf piklerin ve omuzların da ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Böylece spektrum daha net bir şekilde görülebilmektedir.

1976 yılından beri Türev Spektrofotometresinin birçok konulara uygulanabilirliğinin artması, makro analiz ve mikro kimyadaki çalışmaları gerektiren problemlerin güncelliği ile elektronik alanındaki hızlı gelişmesine dayandırılabilir.

Bu çalışmada, Phe, Tyr ve Trp üçlü aminoasitlerin, UV/VIS-Türev Spektrofotometresi ile kantitatif olarak analizlenmesi için gerekli optimum koşulların belirlenmeye çalışılırken, biyokimyasal örneklerden olan yem proteinlerinde bulunan bu üç amino asit miktarlarının saptanmasına çalışılmaktadır.

*

2. TEORİK KISIM

2.1 Klasik Yöntemlerle Amino Asit Analizleri

Proteinlerde ve serbest halde bulunan aminoasitlerin kantitatif olarak belirlenmesi için spektrofotometrik ve kromatoğrafik teknikler uygulanmaktadır. Bu amaçla kullanılan spektrofotometrik ve kromatoğrafik tekniklerin temel ilkeleri aşağıdaki şekilde anlatılmaya çalışılmaktadır.

2.1.1 Spektrofotometrik Olarak Amino Asit Analizleri

Amino asitlerin kimyasal yollarla analizleri; Ninhidrin, 2-hidroksi-5-nitrobenzil bromid, p-dimetil amino benzaldehit gibi belirteçlerle oluşturdukları komplekslerin UV/VIS bölgede soğurumları gerçekleştirilerek yapılmaktadır. Bu amaç için uygulanan metodların temel ilkeleri aşağıdaki gibidir.

Ninhidrin Metodu(Concon, 1975): serbest amino asitlerin, N-terminali ile ninhidrin reaksiyona girerek elde edilen kompleksler farklı dalgaboylarında soğurum yapmaktadır. Bu metod sırasında uygulanan işlemler kısaca şöyle özetlenebilir. Serbest veya denatürasyon sonucunda serbest hale geçen amino asitler, formik asit HCl çözeltisindeki ninhidrin ile muamele edilir. Elde edilen kompleksin farklı dalgaboylarında soğurumları ölçülerek kantitatif analiz yapılır. örneğin, Triptofanın ninhidrin ile yaptığı kompleks mavi renke olup 390 nm de maksimum soğurma yapmaktadır.

Koshland Metodu(Friedman ve Finley, 1975): Bu metod da 2-hidroksi

*

-5-nitro benzil bromid komplekstirici olarak kullanılmaktadır. Proteine bağılı amino asitler 24 saat 37 C° de üre ile muamale edilerek serbest hale getirilirler. Elde edilen serbest amino asitler 2-hidroksi-5-nitro benzil bromid ile etkileştirilerek meydana gelen çökelek alkolle yıkanır. Çökelek HCl de çözülerek absorbands ölçümleri alınır ve kantitatif olarak amino asit miktarı hesaplanır.

P-Dimetil Benzaldehit (DAB) Metodu (Concon, 1975): bu metod, saflaştırılmamış proteinlerdeki amino asit miktarlarınının saptanmasında da iyi sonuç vermektedir. Protein denatürasyonu enzimler aracılığı ile yapıldığında daha iyi sonuçlar elde edilmektedir. Proteinler enzimlerle hidroliz edildikten sonra DAB ile etkileştirilerek kompleks oluşturulur. Meydana gelen kompleksin farklı dalgalaboylarındaki soğurumlarından yararlanılarak kantitatif analiz yapılır.

2.1.2 Kromotoğrafik Olarak Amino Asit Analizleri

Amino asit analizlerinde kullanılan başlıca kromotoğrafik teknikler; Yüksek Performanslı sıvı kromotoğrafisi (HPLC), iyon-değişim kromotoğrafisi, Kağıt elektroforezi ve ince tabaka kromotoğrafisi kullanılmaktadır. 15 yıldan beri iyon-değişim kromotoğrafisi standart teknik olarak kullanılmaktadır. Bu tekniklerin temel ilkelerini kısaca şöyle özetleyebiliriz.

HPLC Kromotoğrafisi (Henschen.A 1985): Aminoasitlerin polar olmayan sabit faz üzerinde ayrılmasının temel ilkeleri Molnar ve Hor-

vath tarafından ileri sürülmektedir. Sürükleyici faz olarak; pH 0.2 ile 2.0 arasındaki tampon çözücüler kullanılmaktadır. Bu tür tamponlarda, amino asitlerin karbolsillik grupları genellikle çözünmezler ve bunların alıkonma zamanları artırılabilir. Dedeksiyon işlemi 200 nm de yapılmaktadır. Amino asitler alkil grubunda yer alan karbon atomlarının sayısına göre absorplanmaktadır ve yüksek polariteye sahip hidrofillik amino asitler, hidrofobik sabit faz üzerinde hareketleri geciktirilmektedir. Hidrofillik amino asitlerin ayrılması için bir çok polar sabit faz kullanılmaktadır. Bunlar; Ters-faz, NH_2 -kolonları, iyon-çifti kompleks faz gibi sabit fazlar kullanılmaktadır.

iyon-değişim Kromatoğrafisi (Lehninger.A.L 1975): iyon-değişim kromatoğrafisinin temel ilkeleri ilk kez W.Cohn tarafından ileri sürülmüştür. Bu yöntemde, çözeltideki moleküllerin yapısında bulunan asit ve bazların davranışlarındaki farklılıklar ile birbirlerinden ayrılmaları sağlanmaktadır. Böyle bir proses için; değişebilir grupları içeren reçine tanecikleriyle doldurulmuş kolonlar kullanılmaktadır. iyon-değişim kromatoğrafisinde genellikle iki tür reçine kullanılır. Bunlar, katyon ve anyon değiştirici reçinelerdir. Amino asit analizlerinde daha çok katyon değiştirici reçineler kullanılmaktadır. Kolonlar; analiz yapılmadan önce NaOH ile dengelenmiş polistiren reçine tanecikleriyle doldurulmuştur. Reçinedeki sulfonik asit gruplarına Na^+ iyonu bağlanmıştır. Sodyum bağlı reçine, asit çözeltisiyle (pH 3) ile yı-

*

kanır. Daha sonra amino asit karışımı kolondan geçirilir. pH 3 de amino asitler geniş bir pozitif yük aralığına sahiptirler. Bu pH da daha büyük pozitif yük taşıyan(lizin, arjinin ve histidin) daha sonra ise en az pozitif yük taşıyan(glutamik ve aspartik asit amino asitler, reçine tanelerine farklı kuvvetle bağlanırlar.Reçineye bağlanan amino asitleri farklı fraksiyonlar halinde toplamak için farklı pH ve farklı derişimlerde NaCl eklenir. Elde edilen amino asitler ninhidrin, fluoresamin ve ftalaldehit ile türevleri oluşturularak kantitatif analiz yapılmaktadır. Bütün bu analitiksel işlemler olan; her amino asitin ayrı bir fraksiyonda toplanması, eklenen NaCl miktarı, pH, verilerin değerlendirilmesi ve kantitatif analiz otomatikleştirilmesinde oluşan sistem "Amino Asit Analyzer" olarak adlandırılmaktadır.

Kağıt Elektroforezi ve ince Tabaka Kromatografisi: Amino asit karışımlarının tayini için diğer bir yöntem ise kağıt elektroforezidir. Bu yöntemde; elektroferez kabına yerlestirilen kağıt(Whatman vb), kabın her iki ucundaki tampon çözeltiye batırılarak ıslatılır. Kağıdın orta bölgesine bir damla amino asit karışımı ilave edilir. Elektroferez işlemi değişik pH larda yapılarak amino asitlerin anoda veya katoda hareket edilmeleri sağlanır. Böylece amino asitler yük değerliğine bağlı olarak yavaş veya hızlı hareket ederler. Kağıtlar kurutulduktan sonra ninhidrin ile boyanarak amino asitlerin lekeler halinde ortaya çıkması sağlanır. Amino asitlerin analizi ve tanınması referans kağıtlarındakilerle kar_

*

şilastırılarak yapılmaktadır.

ince Tabaka Kromatografisinde ise kağıt yerine üzeri slika-jel, alimuna veya seluloz ile kaplanmış cam tabakalar kullanılır. Amino asit karışımları, uygun bir çözgen sistemiyle (buzlu asetik asit-bütanol:su) hareket ettirilerek ninhidrin ile boyanmaktadır. Gerekliğinde lekeler bir spatür ile kazılarak analiz yapılır.

2.2 UV/VIS Bölgede Soğurma (Karagözler.E 1986)

Elektromağnetik spektrumun 400-800 nm arasındaki bölgesi insan gözünün duyar olduğu bölgedir. Görünür bölgeye komşu fakat dalgaboyları daha küçük olan ışınları kapsayan bölge Ultraviyole (UV) bölge olarak adlandırılır. UV-görünür bölge ışınlarının poliatomik moleküller tarafından soğurulması, molekülün elektronik enerji düzeyleri arasında geçişlere neden olur. Bu nedenle bazan bu tür temel ilke olarak kullanan yöntemlere, elektronik spektroskopisi ile de anılmaktadırlar.

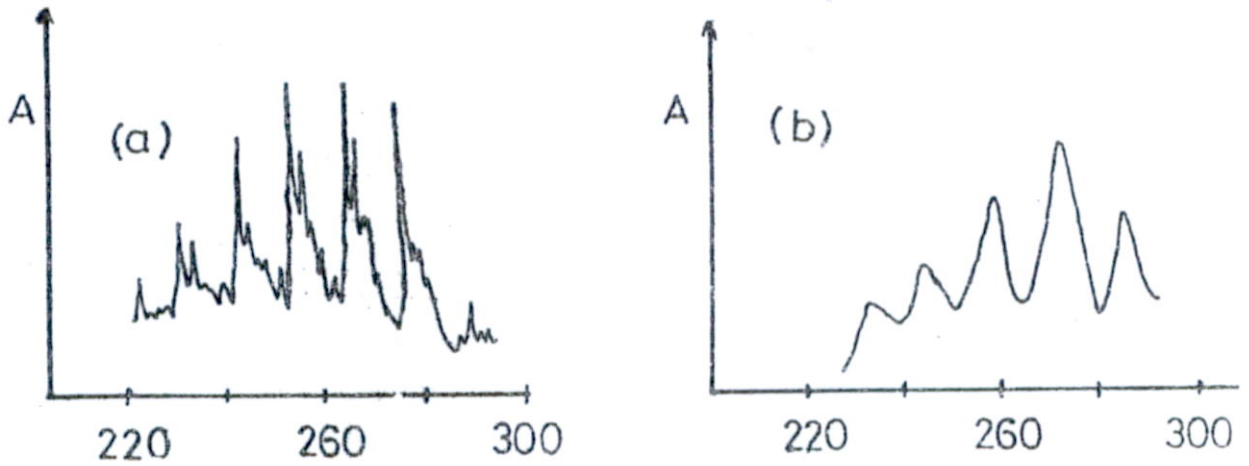
Bir molekülün toplam enerjisi,

$$E = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}}$$

ile ifade edilir. Burada $E_{\text{elektronik}}$; molekülün elektronik enerjisini, $E_{\text{titreşim}}$; molekülün titreşim enerjisini, $E_{\text{dönme}}$ ise dönme enerjisini tanımlar. Bir molekülün her bir enerji düzeyi için birkaç titreşim enerji düzeyi, her bir titreşim enerji düzeyi için ise sayısız dönme enerji düzeyi vardır. Bu nedenle, bir molekül muhtemel enerji düzeyleri sayısı, atomik bir

*

parçacıkla karşılaştırıldığında oldukça fazladır. yine bu nedenle molekül spektrumları keskin ve belirgin bir çizgiler içeren atomik spektrumlarla karşılaştırıldığında oldukça geniş bir dalgaboyu aralığına yayılan absorpsiyon pikleri içerir. Verilen bir elektronik değeri için bir seri titreşim ve dönme enerjilerinin varlığı nedeniyle molekül, enerjileri çok küçük farklılıklar gösteren bir seri Enerji değerine sahip olur. Sonuç olarak molekülün spektrumu birbirine çok yakın bir seri absorpsiyon piki gösterir (Şekil.2.1. 1.a). Ancak; ayırma gücü yeter derecede yüksek aygıtlar kullanılmadığında spektrumda (Şekil.2.2.1.b) bireysel pikler yerine, bireysel piklerin üst üste binmesiyle genişleyen düzgün eğriler gözlenir. Bundan başka kondense fazda ve çözgen molekülleri yanında bireysel pikler daha da genişleyerek şekil .2.1 1.b' de gözlenen türde eğriler ortaya çıkar.

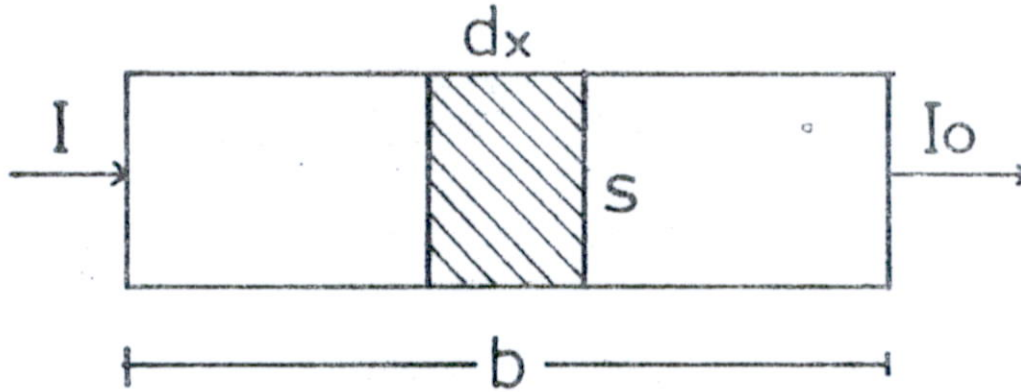


Sekil.2.2.1 Absorpsiyon Spektrumları

*

2.2.1 Lambert-Beer Yasası

Bir soğurma hücresi (katı, sıvı ve gaz) blokunu dikkate alalım;



Şekil.2.2.1.1 Soğurma hücresi

şekil.2.1.1.1 de görüldüğü gibi bu hücrenin blok yüzeyine dik düşen monokromatik ışının başlangıçta I_0 olan gücü, b yolunu aldığı anda absorpsiyon nedeniyle azalarak I değerini alır. Bu blok içinde kesiti S ve kalınlığı, dx , olan son derece küçük kısmı göz önüne alalım. Bu kısımdaki absorplayıcı parçacıkların sayısı d_n olsun ve her bir parçacıkta fotonların yakalandığı yüzeylerin varlığını sayalım. Eğer bir foton bu yüzeylere ulaşırsa derhal absorplanacaktır. Bu kısımdaki yakalayıcı yüzeylerin toplam alanı ds ile gösterilecek olursa, bu kısımda tek bir fotonun yakalanma olasılığı ds/S ile verilebilir. öte yandan bu kısma girmekte olan ışının gücünü I_x ve bu kısımda absorpsiyon nedeniyle azalan gücünü dI_x ile gösterirsek, yakalanan fotonların kesri $-dI_x/I_x$ ile ifade edilebilir ve bu terim yakalanma olasılığına eşittir (Willard vd 1981).

olasalığına eşittir (Willard vd 1981).

$$\frac{-dI_x}{I_x} = \frac{ds}{S} \quad (1)$$

yakalayıcı yüzeylerin toplam alanı bu kısımdaki absorplayıcı taneciklerin sayısı ile orantılı olmalıdır.

$$ds = dn \quad (2)$$

(1) ve (2) eşitlikleri birleştirecek ve sıfır ile n aralığında integre edilecek olursa;

$$-\int_{I_0}^I \frac{dI_x}{I_x} = \int_{n_0}^n \frac{\alpha dn}{S} \quad (3)$$

elde edilir ve bunun integrasyonu ile,

$$-\ln \frac{I}{I_0} = \frac{\alpha n}{S} \quad (4)$$

eşitliği elde edilir veya logaritmik terim 10 tabanına göre yazılır ve işareti değiştirilecek olursa

$$\log \frac{I}{I_0} = \frac{\alpha n}{2.303 S} \quad (5)$$

elde edilir. Burada n, hücredeki soğurma yapan tanecik sayısıdır. Blok kesitini S, bloğun hacmini V ve derinliğini b cinsinden ifade edersek

$$S = \frac{V}{b} \quad (6)$$

*

yazılabilir. Bu büyüklük (5) eşitliğinde yerine konulacak olursa

$$\log \frac{I}{I_0} = \frac{\alpha n b}{2.303 b} \quad (7)$$

elde edilir. Burada n/V oranı molar konsantrasyon verecek şekilde uygun bir dönüşüme uğrattılacak olursa,

$$C = \frac{1000 n}{6.02 \cdot 10^{23} V} \quad (8)$$

ve bu eşitlik (7) de yerine konulduğunda

$$\log \frac{I}{I_0} = \frac{6.02 \cdot 10^{23} \alpha b C}{2.303 \cdot 1000} \quad (9)$$

elde edilir. Tüm sabitler birleştirildiğinde

$$\log \frac{I}{I_0} = \epsilon b C = A \quad (10)$$

eşitliği bulunur.

Yukarıdaki eşitlik Lambert-Beer, Beer-Bouguer veya sadece Beer yasası olarak ifade edilen yasanın matematiksel ifadesidir. Logaritmik terim absorptans olarak isimlendirilir. Burada C, molar derişim, ϵ molar absorptivite, b ise ışık tarafından alınan yolu cm cinsinden ifade edilmektedir.

*

2.2.2 Lambert-Beer Yasasından Gözlenen Sapmalar

Cözeltelerde Beer yasasından gözlenen sapmalar üç katagoride toplanabilir.

a) Gerçek sapmalar: Beer yasası $10^{-3}M$ veya daha seyreltik çözeltilerin absorpsiyon davranışlarını açıklamakta başarılıdır. Derişik çözeltilerde ($10^{-2}M$), çözeltideki soğurum yapan tanecikler aralarındaki ortalama uzaklık, biribirlerinin yük dağılımını ve sonuç olarak biribirlerinin absorplama yeteneklerini değıştirecek ölçüde kısaltmışlardır. Yani Beer yasası seyreltik çözeltiler için geçerlidir.

b) Aletten kaynaklanan sapmalar: Beer yasası gerçek anlamda monokromatik yani tek dalgaboylu ışın kullanılması halinde geçerlidir. Oysa pratikte bu teknikte kullanılan optik düzenek ile elde edilen ışının belli bir dalgaboyu genişliğı vardır. Eğer bu dalgaboyu aralığında soğurma katsayısı değışiyorsa, ölçülen absorbans değıeri Beer yasasında hesaplanandan farklı olacaktır. Bu nedenle kantitatif analizde absorpsiyon ölçümleri, mümkün olduğu ölçüde maksimum pik veren dalgaboyunda yapılmalıdır. Aksi halde konsantrasyon ile absorbans arasındaki ilişki lineerlikten sapma gösterir. Bu ise konsantrasyonda yüksek bağıl hatalara nede olur.

c) Kimyasal Sapmalar: Dissosiasiyasyon, assosiasiyasyon, plimezasyon ve solvatasyon gibi kimyasal etkiler Beer yasasından sapma

*

ra neden olur. Örneğin benzoik asit derişik çözeltide kısmen, seyrek çözeltide ise oldukça ayrışır (Galen vd 1975).



Yukarıdaki denklemde görüldüğü gibi, $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$ 273nm de maksimum absorbans göstermektedir. Eğer ortamda, su varsa $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$ hidroliz olarak $\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-$, benzoat iyonu meydana getirir. Bu da 268nm de maksimum absorbans gösterir. Sonuç olarak $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$ 'ı hidroliz olayından dolayı 273 nm de tamamını tayin etmek mümkün olmamaktadır.

2.2.3 Işınının Organik Maddeler Tarafından Soğurumu

UV-görünür bölge ışınının absorpsiyonu ile molekülün dış kabuk veya bağ elektronları daha yüksek enerji düzeyine uyarılırlar. Bütün organik moleküller, daha yüksek enerji düzeyine uyarılabilen değerlik elektronları taşımalarından ötürü elektromagnetik ışınımı absorplar. Tekli bağlar oluşturan elektronların uyarılmaları oldukça enerji gerektirir (180nm). UV bölgenin dalgaboyu 180nm den küçük olan bölgesi vakum Ultraviyole olarak isimlendirilir. Çünkü atmosfer bileşenleri de bu bölgede oldukça şiddetli absorpsiyon gösterirler. Vakum Ultraviyole bölgesinde deneysel olarak çalışmak oldukça güç olduğundan, çoğu spektrofotometrik çalışmalar 180nm den daha

*

yüksek dalgaboylarında gerçekleşir. Dalgaboyları 180nm den büyük UV ışınımalar bağıl olarak düşük uyarılma enerjisine sahip değerlik elektronları taşıyan sınırlı sayıda fonksiyonel gruplar tarafından absorplanır. Bu gruplar kromofor olarak isimlendirilmektedir. Kromofor terimi eski yunancada renk taşıyıcı anlamına gelmekte olup, orjinal olarak bir maddenin renkli görülmesine neden olan gruplar için kullanılmıştır.

Organik maddelerin absorpsiyon karakteristiğini enerjisi en düşük moleküller orbittaldeki bir elektronun enerjisi en düşük ve dolmamış durumdaki orbitalle dönmesiyle oluşan enerji farkından dolayı absorpsiyon yapmasından kaynaklanmaktadır.

Atomlar arasında bağ oluşumuna katılan elektronlar (σ ve π orbitallerindeki elektronlar) ile dış kabuktaki bağ yapmamış (ortaklanmamış) Oksijen, kükürt ve azot gibi atomlar üzerinde olan elektronlar (n elektronları) arasında meydana gelen, $\pi-\pi^*$, $\sigma-\sigma^*$, $n-\pi^*$, $\pi_2-\pi_3$, bağ-antibağ orbitalleri arasındaki elektronik geçişlere neden olmaktadır. Bağ-antibağ orbitalleri arasındaki enerji farkları değişik olduğundan, organik maddelerin farklı dalgaboylarında absorpsiyon yapmasına yol açmaktadır.

2.2.4 Işınımın Anorganik Türler Tarafından Soğurumu (Karagözler 19)

Çözeltideki inorganik türlerin görünür bölge spektrumları organik moleküllerde olduğu gibi, ince yapı göstermeyen geniş bantlar verirler. Ancak bazı lantanit ve aktinitler bunun aksine

*

davranışlar gösterdiklerini not etmeliyiz.

Analitik açıdan önemli olan anorganik türlerin en önemlilerini 1. ve 2. sıra geçiş metalleri oluşturur. Bu 18 metalin iyonları ve kompleksleri, metalin bazı oksidasyon sayıları hariç renklidir. 1. ve 2. sıra geçiş metallerin karakteristiği kısmen dolu 5d orbitallerine sahip olmalarıdır. Bu metal iyonlarının spektral özellikleri, enerji düzeyleri farklı d orbitalleri arasındaki elektronik geçişten kaynaklanır.

Dış manyetik ve elektrik alanların yokluğunda (seyreltik gaz hali) 5d orbitallerinin enerjisi özdeştir. Fakat çözelti halinde metal iyonu su veya başka ligand molekülleri ile kompleks oluşturur ve ligand elektron çifti ile çeşitli d orbitallerindeki elektronlar arasındaki itme, d orbitali enerji düzeyinde yarılmalara neden olur.

Bu yarılmamanın büyüklüğü, Δ , metal iyonunun oksidasyon sayısı ve periyodik çizelgedeki konumuna bağlı olmakla birlikte, ligand türüne de bağlıdır. Bu açıdan bakıldığında ligandları, Ligand alanı kuvvetlerine göre sıralamak mümkündür; $I^- > Br^- > SCN^- > Cl^- > H_2O > NH_3 > etilendiamin > o\text{-fenontrolin} > NO_2^- > CN^-$, ligand alanı kuvveti fazla olan ligand, daha büyük Δ değerlerine neden olur.

Anorganik türlerin analitik açıdan en önemli türü yük transfer absorpsiyonudur. Bu tür absorpsiyon bantlarının şiddetleri oldukça yüksek ($E_{max} 10000$) olduğundan, absorplayıcı

*

türlerin oldukça duyar bir şekilde tayini olasıdır. Pek çok anorganik ve organik kompleksler yük transfer absorpsiyonunu gösterirler ve bu nedenle yük transfer kompleksleri olarak adlandırılırlar.

Bir kompleksin yük transfer spektrumu göstermesi için kompleks bileşenlerinden birinin Lewis bazı diğeri ise Lewis asidi karakterinde olması gerekir. Kompleksi oluşturan iki moleküller türden vericinin (Lewis bazı) dolu bağı yapmayan orbitali, alıcının (Lewis asidi) boş orbitalleri ile binışerek iki yeni moleküller orbital oluşturur. Böyle bir kompleks uygun dalgaboyundaki ışınımı absorplandığından verici tarafından sağlanan elektron, yeni oluşan ve daha çok alıcıya ait olan orbitale uyarılır. Yani uyarılmış hal, bir tür iç redoks olayının sonucudur.

2.2.5 UV/VIS Spektrofotometresinde Kalitatif ve Kantitatif Analiz

Kalitatif Analiz : Absorpsiyon spektroskopisinin organik moleküllerde en çok dikkate alınan geçişleri $n-\pi^*$ ve $\pi-\pi^*$ geçişlerdir. Bunların enerjileri bağıl olarak daha düşük olduğundan bu geçişlere karşılık gelen pikler spektrumun deneysel olarak uygun olan 200-700 nm aralığında ortaya çıkar.

$n-\pi^*$ geçişlerine karşılık gelen piklerin molar absorptivite, tüm geçişler içerisinde en küçük olanıdır. $\pi-\pi^*$

*

gecişlerinin molar absorptivite değerleri ise bundan 100-1000 kez daha büyüktür. Bu iki geçiş arasındaki bir diğer önemli fark ise çözünenin bu geçişlere olan etkisidir. Çözgen polaritesi artırıldıkça $n-\pi^*$ geçişlerine karşılık gelen pik maksimumları daha kısa dalgaboylarına kayar. $\pi-\pi^*$ geçişlerinde ise genellikle bunun tersi yönde, yani uzun dalgaboylarında bir kayma gözlenir.

Organik moleküllerin UV bölgedeki spektrumlarını açıklayabilmek için önce bir ana sistem belirlenir. Ana sistemler için genellikle kojuge dienler, benzen halkası ve kojuge karbonil sistemleri benimsenmiştir. Yani spektrumunu alacağımız molekülün yapısında yer alan sistemlerden yalnızca ana sistemi biliyoruz. Moleküldeki diğer sistemlerin, ana sistemin pik maksimumunu ne kadar değiştireceği hesaplanarak molekülün yapısı hakkında bilgi sahibi olunabilir. Bu ana sistemlere diğer sistemlerin katılmasıyla oluşan yeni sistemlerin spektral karakteristikleri verilmiş ise de UV-görünür bölge spektroskopisi, organik yapı analizi söz konusu olduğu zaman IR ve NMR gibi tekniklerle karşılaştırıldığında oldukça yetersiz kalır. Bununla birlikte saflaştırılmış örnek maddesinin spektrumu, saf maddelerin spektrumları ile karşılaştırılarak ya da çeşitli atlaslardaki spektrumlarla karşılaştırılarak kalitatif analiz yapılabilir. Özellikle atlaslardaki verilerle karşılaştırma halinde her iki maddenin spektrumunun aynı koşullarda alınması gerekmektedir.

Kantitatif Analiz : Absorpsiyon spektroskopisi kantitatif analizde kimyacıya en yararlı tekniklerden birisidir. Çok geniş bir uygulama alanı vardır. Özellikle anorganik türlerin yük transfer komplekslerinin oldukça yüksek molar absorptiviteye ($\epsilon=10000-40000$) sahip olmalarından bu tür maddelerin $10^{-4}-10^{-6}M$ derişimde rahatlıkla analizlenebilmektedir. Bazı yapı türlerinde ise $10^{-7}M$ derişimlerinin bile tayin edilmesi mümkün olmaktadır. Ayrıca deneysel parametrelerin dikkatli bir şekilde ayarlanması ile analitin seçimli olarak analizi gerekir. Tekniğin doğruluğu %1-3 mertebesindedir, ancak özel metodlarla binde birden daha düşük bir mertebeye indirilebilir.

UV-görünür bölgede absorpsiyon gösteren organik, anorganik kromoforların ve yük transfer komplekslerinin sayısı oldukça fazladır. Ayrıca 200-800 nm aralığında absorpsiyon göstermeyen ya da zayıf absorpsiyon gösteren pek çok inorganik ve az sayıda organik türler, çeşitli komplekstiriciler yardımıyla anılan bölgede absorplayıcı hale getirilebilir.

Bir maddenin absorpsiyonunun; çözgen türü, çözeltinin pH'sı, sıcaklık, elektrolitin derişimi ve girişim yapan maddelerden etkileneceği hatırdan çıkarılmamalıdır. Bu değişkenlerin etkileri gözönüne alınarak analitik çalışma koşulları belirlenmelidir. Girişimden kaçınmak için gerekirse, pik maksimumundan başka bir dalgaboyunda çalışılmalıdır.

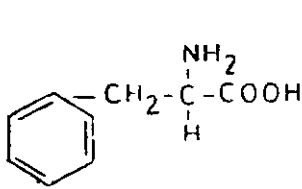
Kantitatif analiz; absorpsiyon ile derişim arasındaki

*

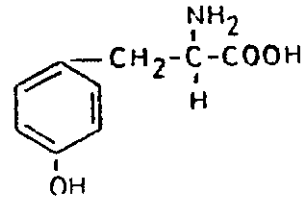
iliskiden yararlanılarak yapılır. Ancak bu iliski basit bir iliski olmadığından deneysel olarak belirlenmelidir. Bunun için seçilen bir dalgaboyunda örnek ve standart maddeleri için ölçüler absorbens değerleri, derişime karşı grafiğe geçirilerek elde edilen kalibrasyon eğrileri kullanılır. Analiz için seçilen dalgaboyu, hem Beer yasasına uygunluğu sağlamalı hemde derişimdeki birim değişme ile absorbanstaki maksimum değişmeyi sağlayan pik maksimumun karşılık gelen dalgaboyu olmalıdır.

2.2.6 Proteinlerin UV/VIS Bölgede Soğurumları

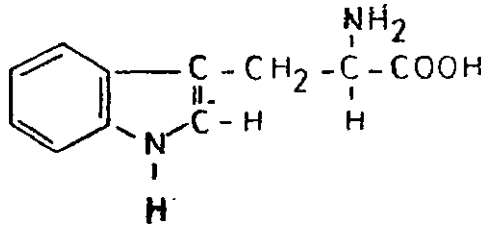
Bütün Protein ve proteinlerden meydana gelen bileşikler, UV bölgede absorbens yapmaktadırlar. Proteinlerin bu bölgede absorbens yapmalarının nedeni yapılarında yer alan aromatik aminoasitlerden kaynaklanmaktadır. Bunlar Fenilalanin(Phe), Triptofan(Trp) ve Tirozin(Tyr) aminoasitleridir. Bu aminoasitlerin açık formülleri aşağıdaki şekildedir.



Fenilalanin(Phe)



Triptofan(Trp)



Tirozin(Tyr)

*

Phe 240 ile 260nm arasında, Tyr ve Trp ise 270-280nm dalgaboyu aralığında absorbands yapmaktadır. Bütün proteinlerin yapısında bu üç aminoasitin de varolmasından dolayı; protein spektrumları üç ayrı absorbands bandının üst üstte çakışmasından meydana gelmektedir

Bu tür spektrumlar kantitatif analiz açısından analitik bir problem olarak ortaya çıkmaktadır. UV/VIS Spektroskopi ancak tek bileşenli maddelerin kantitasyonu için yararlı bir tekniktir. Dolayısıyla proteinlerdeki aromatik aminoasitlerin absorbandslarından meydana gelen üçlü bileşimlerin kantitatif analizi mümkün olmamaktadır.

Bu tür spektrumlar kantitatif analiz açısından analitik bir problem olarak ortaya çıkmaktadır. UV/VIS Spektroskopi ancak tek bileşenli maddelerin kantitasyonu için yararlı bir tekniktir. Dolayısıyla proteinlerdeki aromatik aminoasitlerin absorbandslarından meydana gelen üçlü bileşimlerin kantitatif analizi mümkün olmamaktadır.

2.3 UV/VIS Türev Spektrofotometresi

1950'li yıllarda HAMMOND, PRICE, TANNENBAUR ve MORRISON (Talsk v 1978a); Türev Spektrofotometresinin ilkelerini ortaya koymuşlardır. Daha sonraki yıllarda deneysel olarak çizilen spektrumların türevlerinin alınmasıyla birçok analitik problemlerin çözümlerine uygulanmaya başlandı. Türev işlemlerini kullanabilen analitik yön

*

temler aşağıdaki şekilde verilebilir.

- UV/VIS Absorpsiyon Spektrofotometrisi
- IR ve RAMAN Spektrometrisi
- NMR Spektrometrisi
- Alev yayım ve Alev Atomik Soğurma Spektrometrisi
- Lüminesans Spektrometrisi
- Atom ve Moleküller Flouresans Spektrometrisi
- Gaz Kromatografisi
- Potansiyometrik titrasyon ve diğer analitik yöntemler
- Reaksiyon kinetiğinin araştırılması(katalimetri)

Diğer spektroskopik tekniklere nazaran Türev Spektrofotometresinin daha çok UV/VIS alanında uygulamaya girmesinin nedeni, sıvı ve çözülmüş maddeler buhar halindeki maddelere nazaran UV/VIS Spektrofotometresinde daha keskin çizgiler yerine çoğu zaman az karakteristik olan az veya çok yayılmış spektrumları verdikleri önceki bölümde bahsedilmişti. Yani UV/VIS bölgesinde üst üste çakışan spektrumların daha sık görülmesinden kaynaklanmaktadır. Diğer bir neden ise, UV/VIS Spektrofotometresinde ayırım gücünün zayıflığı yanında sinyal/gürültü oranında düşük olusudur. Türev uygulamaları bu sorunların tümüne belli oranda çözüm getirebilmekte, karakteristik pikleri az olan spektrumların ayırım gücünü oldukça düşük bir bedelle artırabilmektedir. ödenen bedel

*

ise sinyal/gürültü oranında bir azalmanın başlaması, pik şekillerinde bozulma ve dönüm noktası kaymalarıdır.

1976 yılından beri Türev Spektrofotometresinin birçok konulara uygulanabilirliğinin artması ve bu konuların daha çok mikroanalitik ve mikrokimyasal çözümler için kullanılması tekniğin güncellenmesine neden oldu(Talsky 1980).

Bu gün UV/VIS Spektrofotometresinin başlıca kullanım alanları şöyle sıralanabilir,

- Eser analiz(Organik ve inorganik)
- Saflık ve Kalite kontrol
- Spot testlerin belirtilmesinde
- Adsorplanan maddelerin kontrol edilmesi
- Farklı fonksiyonların belirtilmesinde

1980'li yıllarda Türev Spektrofotometresi, elektronikteki gelişmelere paralel olarak hızla gelişmeye uğradı. Elektronikteki gelişmeler sonucunda anında türev alınarak piklerin ayrılması sağlanmıştır. Bunun sonucunda türevlendirilme ile spektrum daha detaylı ve net bir görünüm sağlamaktadır. Bilindiği gibi IR spektrumları çok pik göstermektedir. Böyle bir spektrumun tümünün türevlendirilmesiyle pik sayılarında artış gözlenerek, spektrum daha karmaşık hale gelmektedir. Dolayısıyla spektrumları değerlendirmek oldukça zorlaşır. Ancak inceleme konusu dar bir bölge için uygulandığında yarar sağlar. Buda günümüzde bilgi

*

işlem teknolojisi ile belleğe alınan verilerin istendiği gibi dilimlenmesi, büyütülmesi v.s gibi işlemler yardımıyla kolayca amaca varılabilir.

Spektrumun türevlendirilmesiyle maksimum absorbanza karşılık gelen dalgaboyunda, maksimum-minimum absorbanans değerleri karakteristik özellik taşımaktadır. Kantitatif analizde bu farklar değerlendirilerek sonuca gidilir.

2.3.1 Türevin açıklanması

Matematiksel olarak türev, bir eğrinin veya onun fonksiyonun bir noktasından geçen teğetin eğimini vermektedir. Bir spektrumun belli bir noktasındaki eğimin hesabı için gerekli koordinat sistemini dalgaboyu(λ) ve absorbanans(A) değişkenleri oluşturmaktadır(Talsky 1978b).

Lambert-Beer yasaının geçirgenliğe göre ifadesi,

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\epsilon bc} \quad (1)$$

Burada, I_0 :gelen ışının şiddeti, I :ayrılan ışının şiddeti
 C :Çözeltinin derişimi(mol/lt), b :Işının aldığı yol (cm)
 ϵ :Molar absorptivite

şeklinde tanımlanmaktadır.

Böyle bir fonksiyonun 1. türevi alındığında,

$$\frac{\frac{dI}{d\lambda}}{I} = -C b \frac{d\epsilon}{d\lambda} \quad (2)$$

*

eşitliği elde edilir.

Birinci türevde, herbir dalgaboyunda (dalgaboyundaki birim değişim) derişimle orantılıdır. Spektrumun dönüm noktasında (yani maksimum absorbansa karşılık gelen dalgaboyunda) $d\epsilon/d\lambda$ oranı en büyük değer almaktadır.

Benzer şekilde ikinci türev alındığında,

$$\frac{d^2 I}{d\lambda^2} = C^2 b^2 \left(\frac{d\epsilon}{d\lambda} \right)^2 - C b \frac{d^2 \epsilon}{d\lambda^2} \quad (3)$$

ifadesi elde edilir.

Eğer, ϵ 'nin birinci türevi yani $d\epsilon/d\lambda$ sifira eşit ise, ilk terim sıfır olacağından ϵ 'nin ikinci türevi yine derişimle doğrudan orantılıdır.

Üçüncü türev ise,

$$\frac{d^3 I}{d\lambda^3} = -C b \frac{d^3 \epsilon}{d\lambda^3} + 3C^2 b^2 \frac{d\epsilon}{d\lambda} \frac{d^2 \epsilon}{d\lambda^2} + C^3 b^3 \left(\frac{d\epsilon}{d\lambda} \right)^2 \quad (4)$$

şeklindedir.

Burada $d\epsilon/d\lambda$ (ϵ 'nin birinci türevi) sıfır ise derişime lineer bir bağımlılık söz konusudur. Geriye kalan terim $(-Cb \frac{d^3 \epsilon}{d\lambda^3})$ olduğundan ϵ 'nin 3. türevi söz konusudur. Dolayısıyla spektrumda çok küçük kıvrımlar, omuzlar ve yatay eğimler dahi ortaya çıkmaktadır.

*

Eğer 1. türev sıfır değilse lineerlikten sapmalar gözlenmektedir.

4. türev aynı şekilde,

$$\frac{d^4 I}{d\lambda^4} = -Cb \frac{d^4 \epsilon}{d\lambda^4} + 4C^2 b^2 \frac{d\epsilon}{d\lambda} \frac{d^3 \epsilon}{d\lambda^3} + 3C^2 b^2 \left(\frac{d^2 \epsilon}{d\lambda^2} \right)^2 - C^4 b^4 \left(\frac{d\epsilon}{d\lambda} \right)^4$$

şeklinde gösterilebilir.

4. türevin derişimle lineer bir bağımlılık göstermesi için $d\epsilon/d\lambda$ ve $d^2\epsilon/d\lambda^2$ oranlarının sıfır olması gerekmektedir. 4. türevde çok hassas eğim değişimleri ve omuzlar ortaya çıkmaktadır.

2.3.2 Analitik Bandların türevleri

Bir Absorpsiyon bandı aynı zamanda analitik band olarak da adlandırılmaktadır. Absorpsiyon spektrumlarında, absorban(A) dalgaboyunun(λ) fonksiyonu olduğundan bu tür spektrumlara teorik olarak bir fonksiyonun denklemine uydurmak mümkündür. örneğin, analitik spektrumlar Gauss ve lorentz fonksiyonlarında yaklaşık olarak ve aynı zamanda Cauchy dağılımı ilede ifade edilebilir.

Gauss'a göre bir analitik bandın absorbanı, E ve dalgaboyu ise,

*

$$E = E_{\max} e^{-C \lambda^2}$$

yazılabilir.

Burada; E_{\max} : maksimum absorbans
 E : herhangi bir dalgaboyundaki absorbans
 C : derişim

Maksimum absorbans, dönüm noktasının apsise olan uzaklığına da bağılıdır ve bu yarım uzaklık olarak tanımlanmakta, S ile gösterilmektedir. Buna göre;

$$S = \sqrt{\frac{2}{C}}$$

şeklinde ifade edilebilir.

Şekil.2.3.2.1.a da Gauss fonksiyonuna uyan basit bir analitik bandın ayrıştırılmaları grafiksel olarak verilmektedir. Temel pikin maksimumu, tek sayılı türevlerde (1.,3.,5.,.....) sıfırı çift sayılı türevlerde (2.,4.,6.,.....) ise minimum ve maksimumları göstermektedir. Türev sayısı artıka bandlar keskinleşmekte ve bantların genişliğı daralmaktadır. Temel bandın dönüm noktası tek sayılı türevlerde maksimumu, çift sayılı türevlerde sıfır noktasını vermektedir. Türev sayısı artıka temel banda karşın aşırı uçlar artmaktadır. Burada görünmeyen uçlar sözkonusudur, ki bunlar temel spektrumda görülmez. Ancak spektrumun dönüm noktalarının türevlendirilmesiyle mümkün olmaktadır. Bu bir taraftan dönüm noktalarının daha iyi belirlenmesine ve spektrumun daha iyi çözülmesini sağlarken, diğör taraftan ekstremelerin çoğalma-

*

sına yol açmaktadır. Bir maksimumun n defa türevi alındığında n+1 kadar ekstrim vermekte, fakat artan türevle olayın berraklığı kaybolmaktadır (Owen 1987).

Türev spektroskopisinin diğer bir avantajlı tarafı ise, eğer spektrumda iki veya daha fazla analitik bandın çakışması durumunda araştırılması isteniyorsa yani Gauss diagramının oluşmasında (Talsky 1978);

$$E(\lambda) = E_1(\lambda_0) + E_2(\lambda_0 - \Delta\lambda)$$

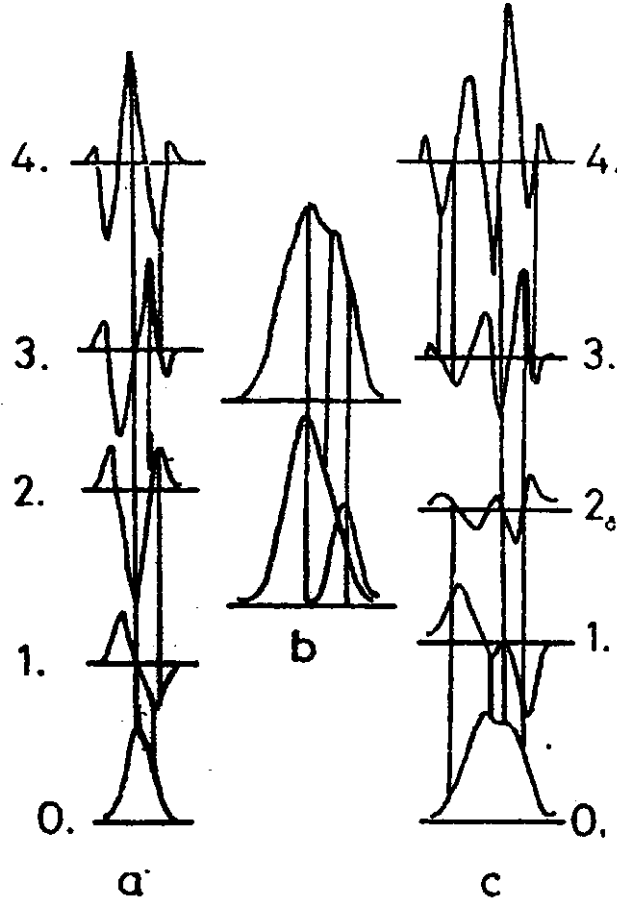
$E(\lambda)$: Maksimum absorpsiyon
 $E_1(\lambda_0)$: λ_0 da maksimum absorpsiyon bandı
 $E_2(\lambda_0 - \Delta\lambda)$: Absorpsiyon bandı ki maksimumu oranı $\Delta\lambda$ kadar kaymış.

Eğer enazından yarım genişlik değeri S , ise u durumda iki eşit Gauss diagramında maksimum absorpsiyondan bahsedilir. Bu durumda 3. ve 4. türevlerde dönüm noktası ortaya çıkar. Şayet yarım genişlik değeri daha küçük ise bu durumda bantlar farklı maksimum ordinatları ile çıkışırve omuz genişlemesi ortaya çıkar. Bantlar birbirine daha yaklaşacak olursa omuzlar tepe noktasına yaklaşır, ki bu bir tür dördüncü dönüm noktasının ortaya çıkmasına bağlıdır (şekil.2.3.2.1.b).

maksimum ordinatları ile çıkışırve omuz genişlemesi ortaya çıkar. Bantlar birbirine daha yaklaşacak olursa omuzlar tepe noktasına yaklaşır, ki bu bir tür dördüncü dönüm noktasının ortaya

*

cıkmasına bağlıdır (şekil.2.3.2.1.b).



Şekil.2.3.2.1

a: Analitik bandın yani bir Gauss diagramın türevi temel spektrum ve 1., 2., 3., 4. türev spektrumları

b: Eşit olmayan iki Gauss diagramını n çakışması

c: üst üste çakışmış ve eşit olmayan iki Gauss diagramın türevi, temel spektrum ve 1., 2., 3., 4. türev spektrumları

*

Eğer enazından yarım genişlik değeri S_p ise u durumda iki eşit Gauss diagramında maksimum absorpsiyondan bahsedilir. Bu durumda 3. ve 4. türevlerde dönüm noktası ortaya çıkar. Şayet yarım genişlik değeri daha küçük ise bu durumda bantlar farklı maksimum ordinatları ile çıkışır ve omuz genişlemesi ortaya çıkar. Bantlar birbirine daha yaklaşacak olursa omuzlar tepe noktasına yaklaşır, ki bu bir tür dördüncü dönüm noktasının ortaya çıkmasına bağlıdır (şekil.2.3.2.1.b).

Böyle bir temel spektrumun türevi alındığında, tepe noktalarının tek sayılı türevlerinde ekstrim bir değer elde edilir. örneğin 3. türevin aşırı maksimumunda olduğu gibi bu paralelde spektrumun daha iyi çözülmesine ve her iki bileşenin kantitatif bir değerlendirilmesine de imkan tanımaktadır (şekil 2.3.2.1.c).

Yukarıdaki Gauss diagramlarında görüldüğü gibi spektrumun dönüm noktalarında dalgaboyunun birim değişimine karşılık absorpsiyon veya diğer bir değişken, örneğin ışımaya (E) sıfır göstereceğinden bu noktada teget eğim sıfır yani apsise paralel olur. Özetle, türev eğrisi sıfırdan geçer. Birinci türev spektrumlarında mutlak değer olarak pik büyüklüğü + ve - iki dönüm noktası arasında orjinal pikin aynısı kalırsa da, orjinal pike göre yarı yarıya küçülmüş iki pik verir. Bunun yanında orjinal pikin dönüm noktası kaybolur ve o dalgaboyunda apsisi

*

absorbansından dolayı, ϵ soğurma katsayısının karakteristik olması piklerin birbirlerinden ayrılmalarını sağlamaktadır.

Kalitatif analizde, saf madde veya bileşenlerin türev spektrumları (daha çok yüksek dereceden $n = 2$) ile analizlenecek madde veya bileşenlerin türev spektrumlarının karşılaştırılması ile analiz yapılması mümkün olmaktadır. Fakat her iki analiz de aynı koşullarda yapılmalıdır.

Türev Spektrofotometresinde kalitatif analiz yardımıyla, özellikle kalite kontrol gibi analizlerin hızlı bir şekilde analizlenmesi sağlanarak yapılması büyük bir avantaj sağlamaktadır.

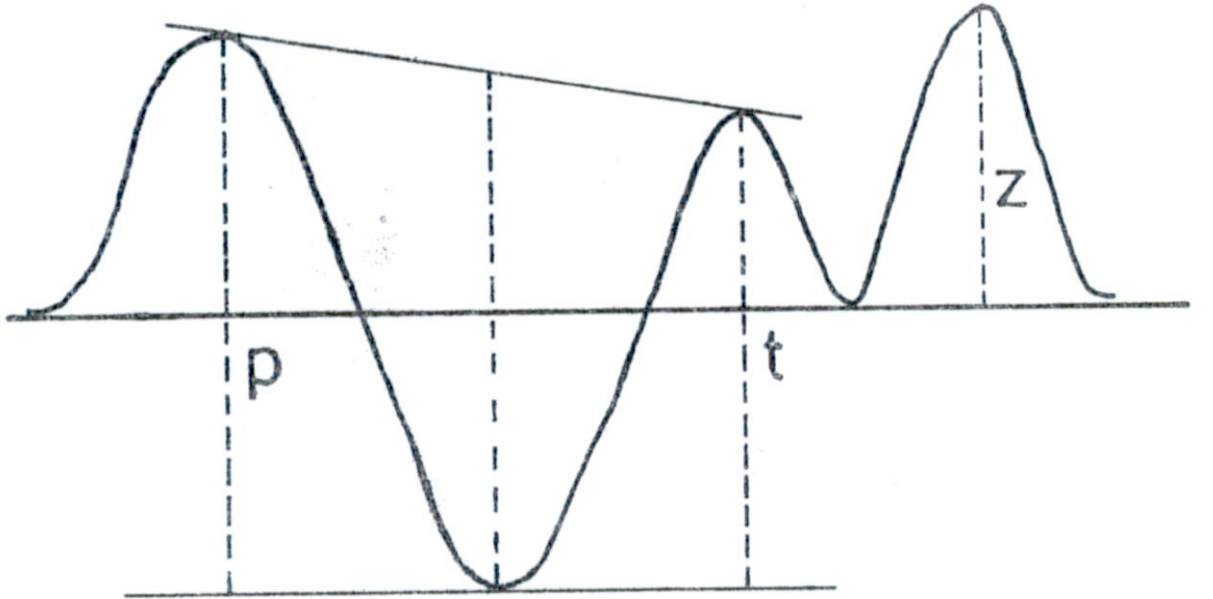
Kantitatif Analiz : Bellirli koşullarda I/I_0 'ın türevleri derişimle doğru orantılıdır. Bu ilişkiden yararlanılarak kantitatif analiz yapılmaktadır. Birinci ve ikinci türev spektrumlarında ordinat değışimleri normal spektrumdaki ordinat değerlerinin büyüklüğü ile değil, eğim değışimi ile ilişkili olduğu nedeniyle türev eğrisinin absisteki konumu ile dönüm noktalarının birbirine karşı durumları karakteristik olur. Kantitatif analizde bitişik, peş-peşe alt ve üst noktalarının mutlak değeri ölçülerek sonuca gidilir. Pratikte genellikle iki yöntem kullanılır (Talsky 1981a).

1-Pikten-Pike ölçüm: yanyana olan maksimum -minum farkı ölçülerek, standart piklere karşı değerlendirilir (Turbid

örneklerde saydam standartlar kullanılır).

2-Eğim Yöntemi: Peşpeşe gelen iki maksimum üzerinden geçirilen teğetin izdüşümü noktasında, arada kalan uzaklığı veya iki minimumdan geçen teğetin aradaki maksimuma izdüşüm noktasındaki uzaklığı ölçülür. Uzaklık, standartların eşdeğer piklerine çizilen teğete karşı değerlendirilerek sonuca gidilir. Çoğu zaman çok bileşen içeren analizlere uygulanır.

Bu üç yöntemin grafiksel olarak gösterilmesi aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Sekil.2.3.3.1. Türev spektrumlarının değerlendirilmesi
Eğim yöntemi (t)
Pikten-Pike ölçüm (p)
Sıfır-Pik maksimumu yöntemi (z)

*

Çok özel durumlarda Sıfır-Pik maksimumu-yöntemi (pik-Zerro) kullanılır. Burada sıfır doğrusundan dikeyin uzaklığı belirlenerek sonuca gidilir. Bu yöntem absise simetrik sinyaller ile yüksek türevlerin değerlendirilmesinde, aynı zamanda birbirlerini örtmeyen tek spektrumlara daha iyi uygulanır.

2.3.4 Türev Spektroskopisinin Uygulama Alanları

Türev Spektroskopisinin uygulama alanları, UV/VIS Spektroskopisinden daha geniştir. Türev Spektroskopisinin multibileşenli sistemlere uygulanması, kalite kontrol gibi güncel konulara uygulanabilirliğinin artmasından dolayı hızla gelişmektedir. Türev Spektroskopisinin uygulama alanları ve uygulanan konular aşağıdaki tabloda verilmiştir

Tablodanda görüldüğü gibi; Gıda kimyasında insanların beslenmesinde yer alan diyetlerin kontrolü, teknolojik açıdan önemli rol oynayan Bentonitler ve polimer kimyası, sağlık açısından önemli olan protein ve aminoasitlerin belirlenmesinde türev spektroskopisi önemli rol oynamaktadır.

Analitik açıdan bakıldığında, çeşitli bileşenlerin karakterize edilmesi, eser düzeydeki element veya organik bileşenlerin tayini ve tayinleri güç olan bileşenlerin tayininde Türev Spektrofotometresi önemli bir yer teşkil etmektedir.

*

Tablo.2.3.4.1 Türev Spektroskopisinin Uygulamaları

Uygulama alanı	Uygulanan Konular	Literatür
Mikroanalitik kimya	a) Eser inorganik analiz b) Eser organik analiz	Talsky 1981
Karakterizasyon	Protein ve sentetik Makro moleküllerin farklılandırılması	Talsky vd 1982a
Kil Kimyası	Bentonitleri aktifleştirilme parametrelerinde Fe(II) ve Fe(III)'in farklılandırılması	önal vd 1987
Gıda Kimyası	Kolada sakkarin tayini Meyva sularında C vitamini analizleri	Richard 1986 özdemir ve Gücer 1987
Klinik Kimyası	Hemoglobin ve Miyoglobin farklılandırılması	Talsky 1983a
Protein Kimyası	Proteinlerin farklılandırılması ve Ar.aminoasit tayinleri	Balestrieri 1978
Çevre Kimyası	Su,hava ve toprak kirliliği	Talsk 1982b
Polimer kimyası	Azogruppenhaltigen polycarbonaten Sitiren/polisitiren akrilamid/poliakrilamid gibi poemrlerin kontrolü	Talsky 1979 Nuyken vd 1980

2.4 Yemdeki Protein Kaynakları ve Proteinlerinin Saflaştırılması

Canlıların büyümesi ve gelişmesi için proteinlerin çok gerekli olduğu daha önce belirtilmişti. Günümüzde birçok evcil hayvanın büyümesi, gelişmesi daha verimli bir şekilde bunlardan yararlanılması için protein ve diğer besi elementlerince zengin maddeler kullanılmaktadır. Yem de bu amaçla kullanılan maddelerden birisidir. Yemdeki proteinler değişik kaynaklardan elde edilmektedir. Bunlar başlıca bitkisel ve hayvansal kökenli maddeler kullanılmaktadır.

Civciv yeminde kullanılan protein kaynakları şunlardır.

a) Bitkisel kökenliler: Buğdaygiller, mısır, küspeler (ayçiçeği, pamuk küspesi, soya küspesi), kepek ve yonca unu

b) Hayvansal kökenliler: Et-kemik unu ve balık unu

Görüldüğü gibi yemlerde çok değişik proteinler kullanılmaktadır. Dolayısıyla yemi, farklı protein sınıflarından oluşan bir karışım olarak tanımlayabiliriz. Bilindiği gibi proteinler çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılmaktadırlar. (Kachmar vd 1976).

Yem proteinleri bu dört ayrı çözgenle ekstrakte edilerek içerdikleri protein sınıfları dolayısıyla birbirinden ayrılması sağlanmaktadır

Proteinlerin değişik çözeltilerdeki çözünürlüklerini ve protein sınıflarını gösteren tablo aşağıda gösterilmiştir.

*

Tablo.2.4.1 Çözünürlüklerine göre protein sınıfları

Çözgen	Protein Sınıfı
0.05 M $(NH_4)_2SO_4$	Albuminler, Histonlar protaminler
0.1 M NaCl	Globulinler
0.1 M NaOH	Gluteinler, Protaminler
%70-80 Etil alkol	Prolaminler

Basit sınıflara ayrılan proteinler içerdikleri hayvansal ve bitkisel hammadde kaynaklarına göz atacak olursak; albuminler ve globulinler bitkisel ve hayvansal organizmalarda geniş oranda bulunurlarken, Glutelinler daha çok bitkisel kaynaklı (Buğdaydaki glutenin), prolaminler ise genellikle bitkilerin tohumlarında bulunurlar (Mısıda zein, buğdaydaki glutenin ve arpadaki hardein)

3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

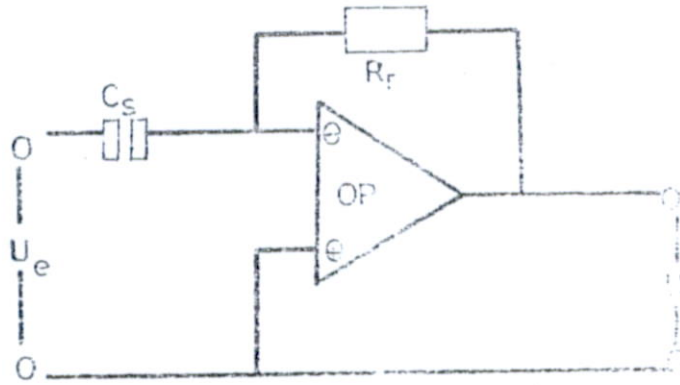
3.1. Materyal ve metod

Çalışmamızda; normal spektrumlar PERKIN ELMER 550 Model Spektrofotometre ile Türev spektrumları ise Talsky (Talsky 1981b) tarafından verilen şema ile bölümümüzde yapılan elektronik türev alıcı devre (şekil.3.1.1) yardımıyla alınmıştır. Ayrıca; analiz işlemlerinde Nüvefüj 650 Model Santrüfüj (5000rpm) ve Hetofring

*

Maraka Çalakalayıcı (160 rpm) gibi yardımcı aletlerde kullanılmıştır.

Bütün spektrumların çiziminde; Spektrofotometre hızı 120nm/dak ve Linear model kağıt hızı ise 6cm/dak olarak ayarlanmıştır.



C_s Kondensatör, R_f Direnç
OP Entegre

Sekil.3.1.1 Elektrik türev alıcı devre

3.1.1 Stok Aminoasit çözeltilerin hazırlanması

1000 ppm Fenilalanin: 0.1gr L-Fenilalanin(Nutritional Biochemicals Corp:4327) balojojede deiyonize suda çözülerek 100 ml ye tamamlandı.

1000 ppm Triptofan: 0.1gr L-Triptofan(Nutritional Biochemicals

*

Corp;5460) 20 ml 0.1 N NaOH de çözülerek balonjojede 100 ml ye deiyonize su ile tamamlandı.

1000 ppm Tirozin: 0.1gr L-Tirozin(Nutritional Biochemicals Corp: 8307) ise 20 ml 1 N NaOH de çözülerek balonjojede 100 ml ye deiyonize si ile tamamlandı.

Fenilalanin(Phe) ve Triptofan(Trp) stok çözeltilerine belirli miktarlarda fosfat tamponu ilave edilerek; pH metre(Nel marka) pH=7 ye ayarlandı.

Tirozin(Tyr) stok çözeltisine ise belirli miktarda Borik asit-NaOH tamponu ilave edilerek pH=10'a ayarlandı.

3.1.2 Sabit pH dakicözeltilerinin hazırlanması(Perrin 1974)

pH=7 için fosfat tamponu kullanıldı:0.02 M 13.96ml

KH_2PO_4 (Merck:5101) + 0.01 M 24.04 ml Na_2HPO_4 (Merck:6576)

pH=10 için Borik asit-NaOH tamponu kullanıldı: [0.1 M 50 ml Borik asit(Merck:160) + 0.1 M KCl(Merck:4935)] + 0.1 M 43.7 ml NaOH (Merck:6462)

3.1.3. Standart çözeltilerin hazırlanması

Amino asitlerin bütün standart çözeltileri 1000 ppm'lik stok çözeltilerinden hazırlandı.

Standart Phe çözeltileri:	50	100	200	400 (ppm),pH 7 de
Standart Trp çözeltileri:	40	60	80	100 (ppm),pH 7 de
Stantart Tyr çözeltileri;	40	60	80	100 (ppm),pH 10 d:

*

3.1.4. Kullanılan Diğer Çözeltiler

a)Proteinleri ekstrakte etmek amacıyla:

- 0.05 M $(NH_4)_2SO_4$ (Merck:6642)
- 0.1 M NaCl (Merck:6400)
- 0.1 M NaOH (Merck:6462)
- % 70-80 'lik etil alkol

b)Protenleri denatüre etmek amacıyla:

- 8 M Üre (Merck:B486)

c)Proteinleri Çöktürmek amacıyla;

- %20'lik Trikloro Asetikasit(Merck:B10)

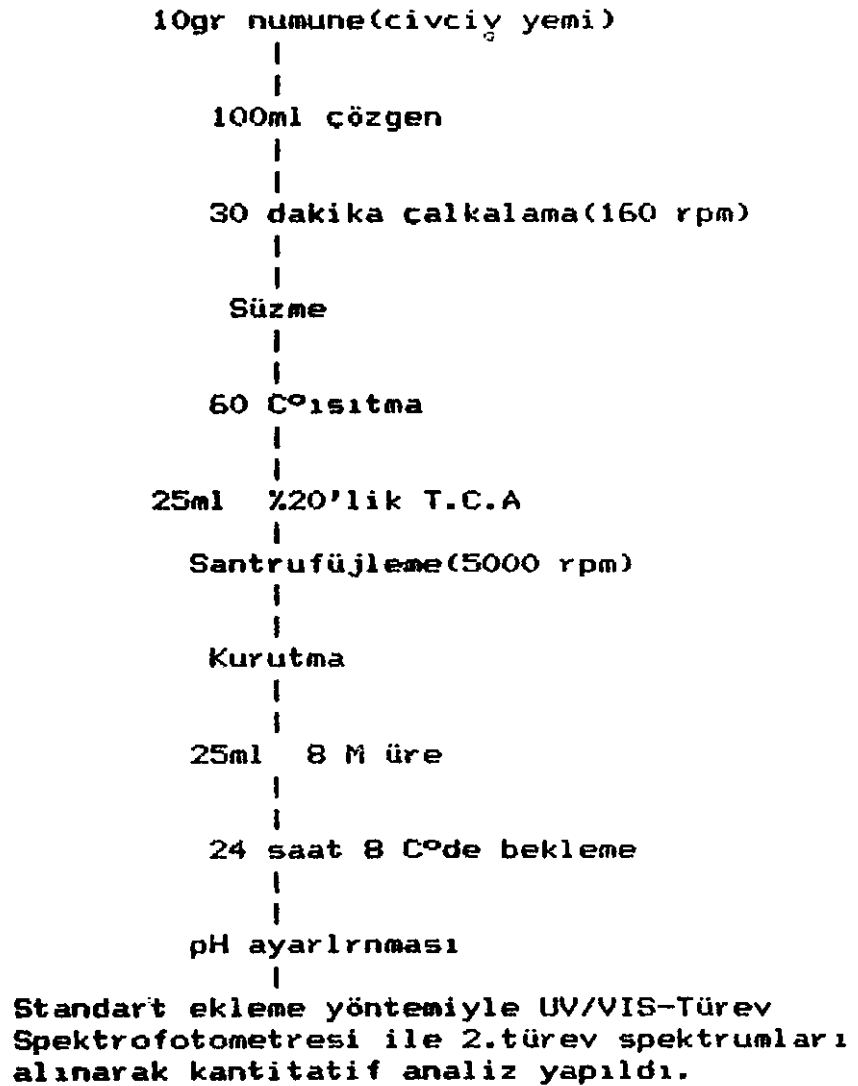
gibi çözeltiler kullanıldı.

3.2 Deneysel işlemler

Malatya Yem Sanayi A.Ş tarafından üretilen civciv yeminden 10 gr alınarak; 100'er ml 0.05 M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 M NaOH , 0.1 M NaCl ve %70-80 lik etil alkol ile, 30 dakika 160 rpm de çalkalayarak proteinlerin ekstrakte edilmeleri sağlandı. Daha sonra kaba süzgeç kağıdından süzülerek elde edilen çözelti, 60 C° ye kadar ısıtılarak proteinler pıhtılaştırıldı. Pıhtılaştırılan protein çözeltisine 25 ml %20'lik Trikloro asetik asit(T.C.A) ilave edilerek proteinler çöktürüldü. 5000 rpm de protein çözeltileri santrüfüjlenerek proteinler elde edildi. Elde edilen proteinler kuru-

*

tulduktan sonra 25 ml 8 M üre ilave edilerek 8 C° de 24 saat bekletilir (Ichikawa, 1979). Böylece proteinler amino asitlerine kadar parçalanırlar. Elde edilen çözelti iki kısma ayrıldı. Birinci kısımda Phe ve Trp analizleri için pH 7 ye, ikinci kısımda ise Tyr analizi için ortamın pH sı 10'a ayarlandı. Standart katma yöntemiyle kantitatif analiz yapıldı. İşlem basamağı şu şekilde şematize edilebilir.



*

3.3 Yemde Bulunan Protein sınıflarının Elde Edilmesi

10 gr yem numunesi ; 100 'er ml 0.05 M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 M NaOH, 0.1 M NaCl ve % 70-80 lik etil alkolle ekstrakte edilerek, yemde bulunan protein sınıfları birbirlerinde ayrılarak elde edilen miktarlar Tablo.3.3.1 de gösterilmektedir.

Tablo.3.3.1 10 gr yemdeki protein sınıflarının miktarları gr olarak verilmiştir.

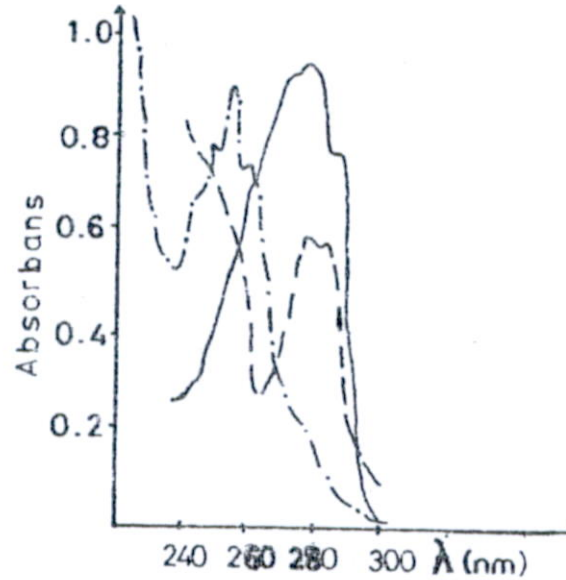
Örnek No	Çözgen	Protein sınıfı	elde edilen protein,gr
1	0.05M $(NH_4)_2SO_4$	Albuminler, Histonlar ve Protaminler	0.74
2	0.1 M NaCl	Globulinler	1.18
3	0.1 M NaOH	Glutelinler, Protaminler	0.96
4	%70-80 Alkol	Prolaminler	0.00
Toplam protein			2.88

IV. TARTIŞMA

Yemde bulunan protein sınıfları denatüre edildikten sonra, fenilalanin(Phe), triptofan(Trp) ve tirozin(Tyr) amino asitlerinin kantitatif olarak analizlenmesi için yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar ara başlıklar halinde tartışılmaktadır.

4.1. Aromatik Amino Asitlerin Temel ve Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Proteinlerin yapısında yer alan üç aromatik amino asitinde 200-300 nm de soğurum yaptıkları daha önceki bölümlerde vurgulanmıştı. Üst üste çakışan spektrumları birbirinden ayırd etmek için, her bir amino asitin temel ve 2. türev spektrumları alınarak Phe, Trp ve Tyr amino asitlerinin spesifik pikleri belirlendi.

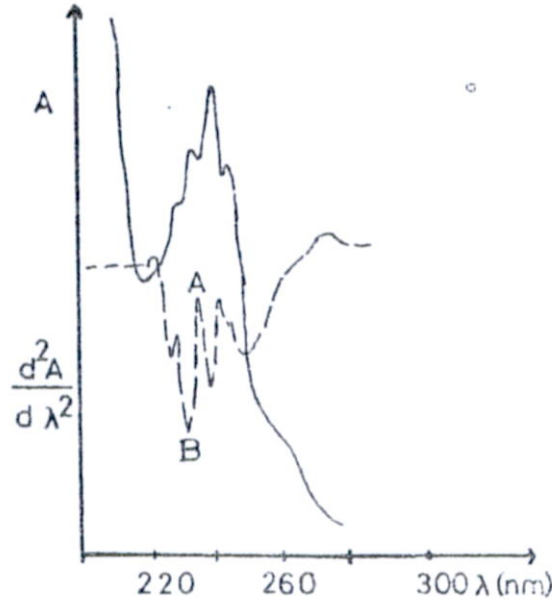


Sekil.4.1.1 Aminoasitlerin temel spektrumları
 (-.-.-.-)Phe'nin pH 7 deki temel spektrumu
 (-.-.-.-)Trp'nin pH 7 deki temel spektrumu
 (—)Tyr'nin pH 10 daki temel spektrumu

Bunun için pH deki $6.0 \cdot 10^{-3} \text{M}$ Phe ve $4.9 \cdot 10^{-4} \text{M}$ Trp çözeltileri ile pH 10 daki $5.0 \cdot 10^{-4} \text{M}$ Tyr çözeltilerinin temel ve türev spektrumları aşağıdaki şekilde tartışılmaktadır.

Şekil.4.1.1 de de görüldüğü gibi, bu üç aminoasittinde birarada varolması nedeniyle spektrum daha karmaşık bir hale gelmektedir. 2.türev spektrofotometresi ile spektrum daha detaylı bir şekilde ortaya çıkmaktadır.

2.türevde Phe'nin 253-254 nm deki spesifik piki ortaya çıkararak diğer iki aminoasitten ayrılması sağlanmaktadır. Phe'nin pH 7 deki 2. türev spektrumu gösterilmektedir.

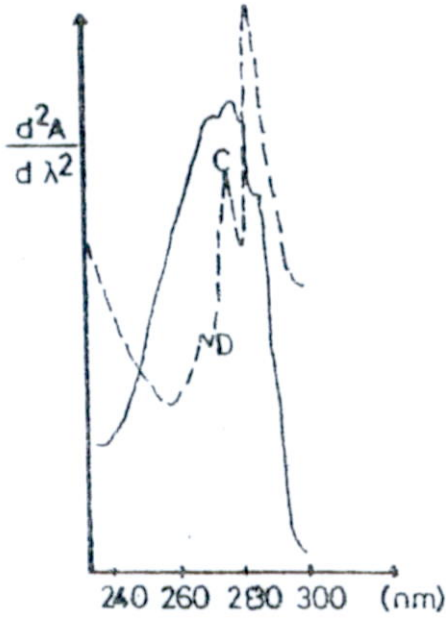


Şekil.4.1.2 Phe'nin pH 7 deki
 (—) Temel spektrum
 (----) 2.türev spektrumu

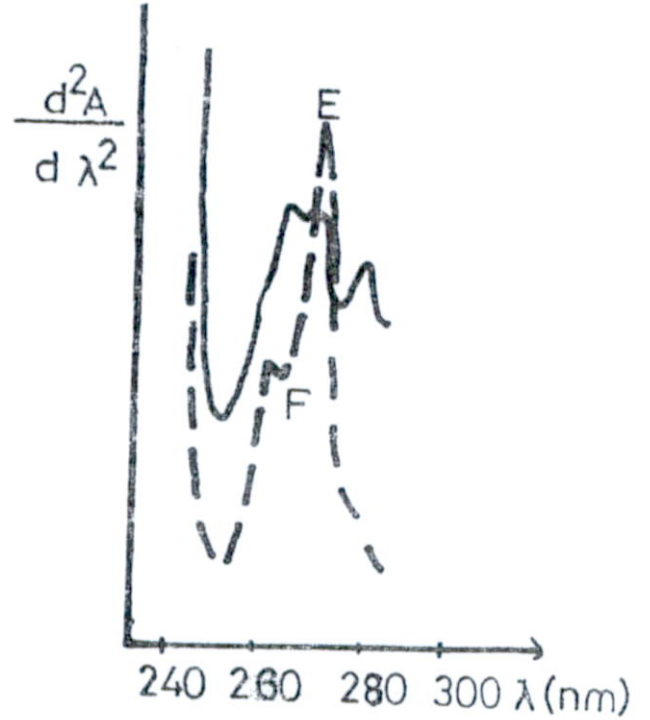
*

Şekilde de görüldüğü gibi A-B aralığındaki maksimum-minimum absorpsiyon farkı derişimle doğrudan orantılıdır.

Diğer iki aminoasit ise 276-280 nm de absorbands yaparak üst üste cakışmıştır. Bu iki aminoasit spektrumlarının birbirinden ayrılması için değişik pH larda 2. türev spektrumları alınarak gerçekleştirilir. Bunun için Trp pH 7 de, Tyr ise pH 10 daki spektrumları alınarak gerçekleştirilir. Böylece Trp 276-278 nm de/C-D aralığı), Tyr ise 278-280 nm(E-F) aralığında spesifik pikleri ortaya çıkmaktadır. Aşağıdaki şekillerde bu aminoasitlerin 2.türev spektrumları görülmektedir.



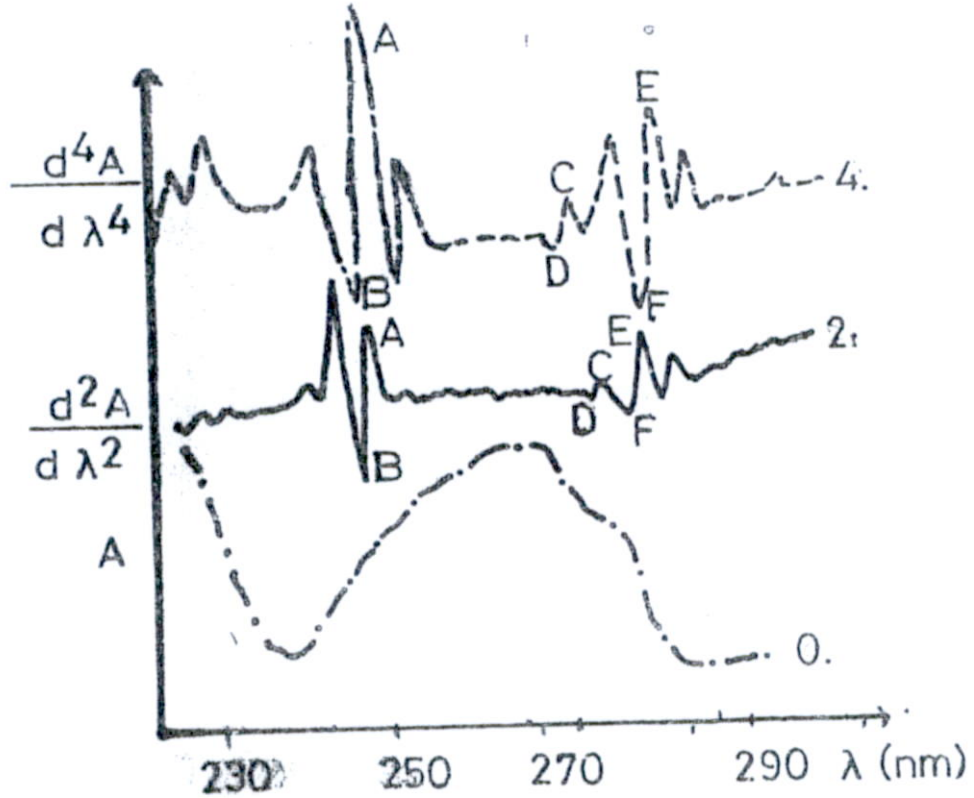
Şekil.4.2.3
Trp'nin pH 7 deki 2.türev spektrumu



Şekil.4.2.4
Tyr'nin pH 10 daki 2.türev spektrumu

4.2. Aromatik Aminoasit Karışımlarının Analizi

Üçlü aromatik aminoasit karışımlarının birbirlerinden ayrılması için ancak belirli mol oranlarında olması gerekmektedir (Talsky 1984). Bu amaçla Phe, Trp ve Tyr sırasıyla aminoasitlerinin toplamının 10 ml ($a+b+c=10$) olacak şekilde 36 seri standart çözelti hazırlanmıştır. Phe $6.0 \cdot 10^{-9}$ M, Trp $4.9 \cdot 10^{-4}$ M ve Tyr ise $5.0 \cdot 10^{-4}$ M standart çözeltileri kullanılmıştır.



Sekil.4.2.1

8:1:1 mol oranındaki aromatik aminoasitlerin pH 7 deki temel spektrumu (---) 2.türev spektrumu (—) 4.türev spektrumu (---)

*

Bütün bu standart çözeltilerle hazırlanan karışımların temel, ikinci türev ve 4. türev spektrumları (4. türev spektrumları dijital olarak Sinclear Marka bilgisayarda alınmıştır) değerlendirildiğinde 8:1:1 (Phe:Trp:Tyr) mol oranında her aminoasit için karakteristik olan pikler birbirinden ayrılmaktadır.

Şekil.4.3.1 de görüldüğü gibi, 2. ve 4. türev spektrumlarında A-B aralığı Phe, C-D aralığı Trp ve E-F aralığı ise Tyr aminoasitlerinin karakteristik piklerini göstermektedir. Aromatik aminoasitlerin birlerinden tamamen ayrılması için 8:1:1 mol oranında olması en iyi ayrılmayı sağlamaktadır.

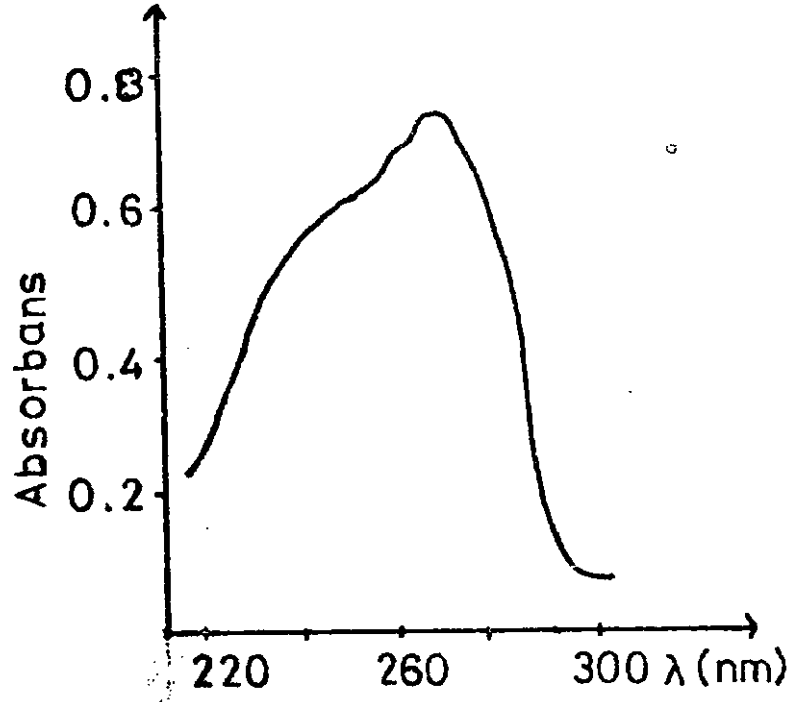
4.3 Yem Proteinlerindeki Aminoasit Piklerinin Belirlenmesi

Bölüm 3.3 deki şekilde elde edilen protein sınıflarından protaminler hem amonyum sülfatta hemde NaOH de çözündükleri için birbirlerinden ayrılması güç olmaktadır. %70-80 lik etil alkol ekstraksiyonunda elde edilemeyen prolaminlerin ise, yemde yeteri kadar olmadığından bulamadığımızı söyleyebiliriz.

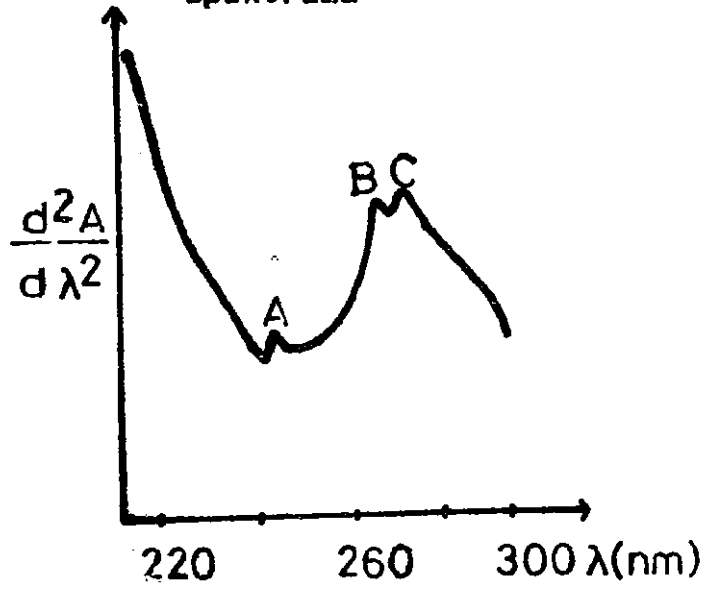
Bölüm 3.1 de değinilen Spektrofotometre ile belirlenen koşullarda alınan, denatüre edilmiş proteinin spektrumu aşağıdaki şekilde gösterilmektedir.

Şekilden de görüldüğü gibi karmaşık bir spektrum ortaya çıkmaktadır. Spektrumda kaç bileşenin olduğu hakkında bir yorum yapmak olanaksızdır. Bu spektrumun ikinci türevi alındığında spektrum daha detaylı bir şekilde bileşenler ortaya çıkmaktadır.

*



Sekil.4.3.1 8 M üredeki denatüre edilmiş proteinin temel spektrumu



şekil.4.3.2

8 M üredeki denatüre edilmiş proteinin pH 7 deki 2.türev spektrumu

*

Denatüre edilmiş protein çözeltisine belirli miktarlarda standart amino asit ilave edilerek spektrum değerlendirildiğinde Spektrumda A piki Phe'ini, B piki Trp'yi ve C piki ise TyrÇ'nin pikini göstermektedir.

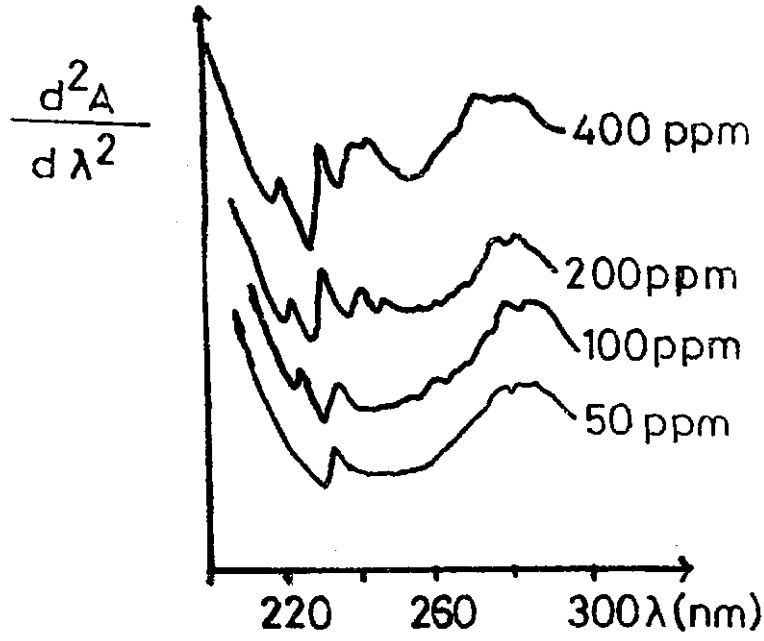
4.4. Aminoasitlerin Kalibrasyon Grafiklerinin Çizimleri

Bölüm.2.2 de de belirtildiği gibi 2.türev derişimle doğrudan orantılıdır. Bu ilişkiden yararlanarak kantitatif analiz yapılmaktadır. Phe için 253-254nm, Trp için 276-278nm ve Tyr için 278-280nm dalgaboyları arasında karakteristik olan maksimum-minimum absorbands farkı ile derişim arasında grafikler çizilerek sonuca gidilmektedir.

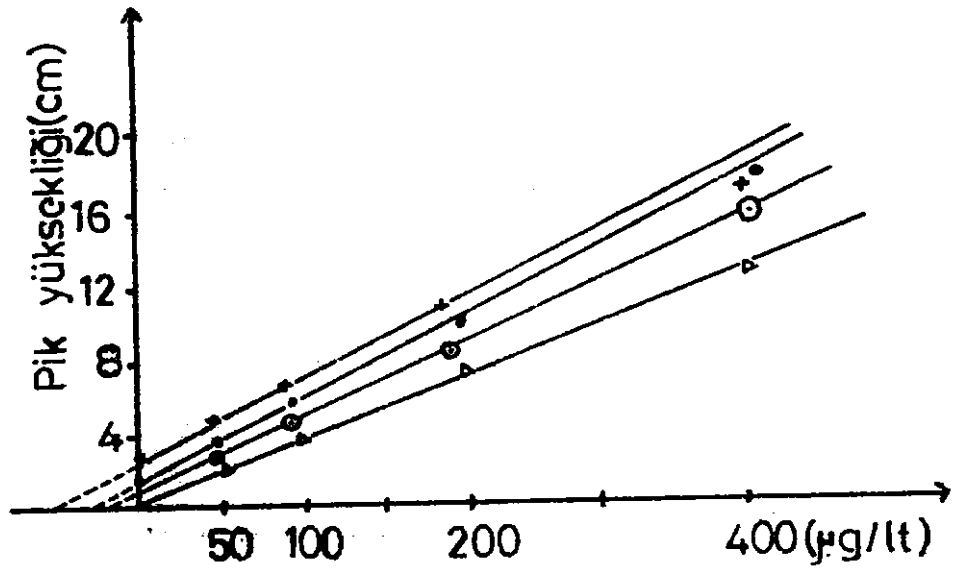
Bu amaçla üç aminoasitin standard çözeltilerinin 2. türev spektrumları ve kalibrasyon grafikleri, aşağıdaki şekillerde gösterilmektedir. Kalibrasyon grafikleri derişime karşı pik yüksekliği(cm) olarak çizilmiştir.

Denatüre edilmiş proteinlerde aminoasit miktarlarının belirlenmesi için standart ekleme methodu kullanılmıştır. Standart ekleme methodu ile çizilen çalışma grafiğikler aşağıdaki şekildedir.

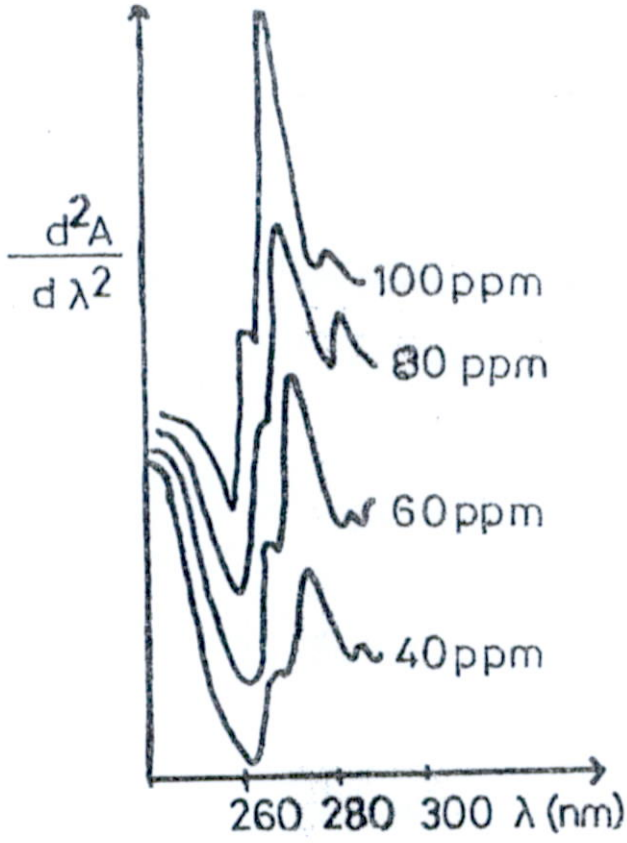
*



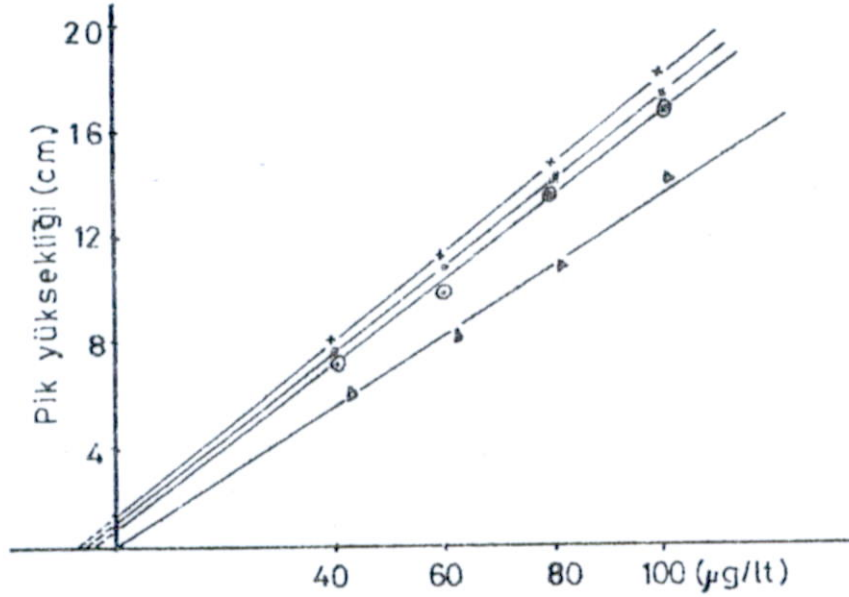
Sekil.4.3.1
Phe'nin değişik standartlarla
pH 7 deki 2.türev spektrumları



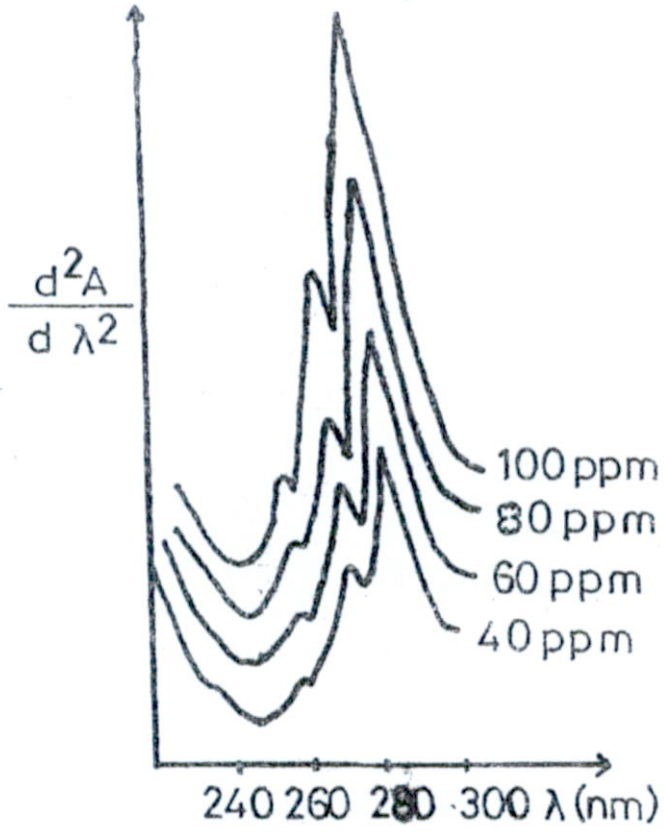
Sekil.4.3.2
Phe için çalışma ve kalibrasyon grafikleri
(*) 3 nolu örnek, (⊙) 2 nolu örnek
(.) 1 nolu örnek, (Δ) standart Phe



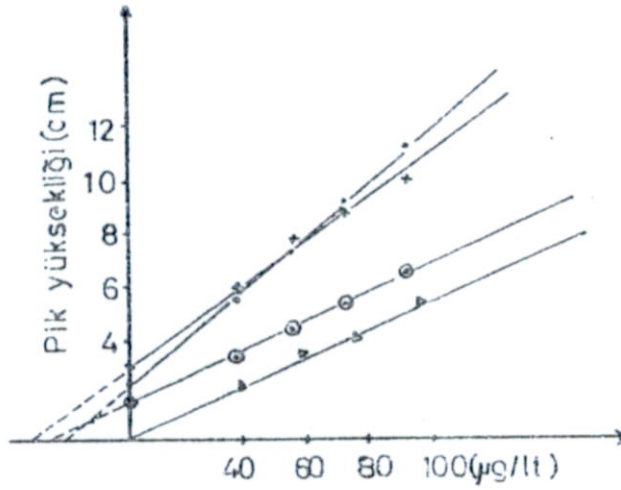
Sekil.4.3.3
Trp'nin değişik standartlarla
pH 7 deki 2.türev spektrumları



Sekil.4.3.4
Trp için çalışma ve kalibrasyon grafikleri
(*) 3 nolu örnek, (⊙) 2 nolu örnek
(.) 1 nolu örnek, (Δ) standart Trp



Şekil.4.3.5
Tyr'nin değişik standartlarla
pH 10'daki 2.türev spektrumları



Şekil.4.3.6
Tyr için çalışma ve kalibrasyon grafikleri
(*) 3 nolu örnek, (⊙) 2 nolu örnek
(.) 1 nolu örnek, (Δ) standart Tyr

4.5 Yem proteinlerindeki Aminoasit Miktarları

Yemde bulunan proteinlerdeki herbir amino asidin kantitatif analizi için, ölçümlerin alındığı dalgaboyu aralığı, pH, yöntem ve geri kazanma verimleri gibi parametreler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo.4.5.1 Aminoasit çözeltilerinin parametreleri

Aminoasit	Dalgaboyu aralığı	pH	Yöntem	% verim
Phe	253-254nm	7	P-P	120
Trp	276-278nm	7	P-P	110
Tyr	278-280nm	10	P-P	105

P-P: Pikten-Pike ölçüm methodu

Tabloda görüleceği gibi, amino asitler için hesaplanan geri kazanma verimlerinin 100 den büyük olmasının nedeni; elektronik devreden kaynaklanan gürültü sinyallerinden geldiği, dolayısıyla amino asitlerin absorpsiyon piklerinin birbirinden iyi bir şekilde ayrılmamasından olabileceği düşünülmektedir.

Standart katma methoduyla yemdeki aminoasit miktarları aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

Tablo.4.5.2 10gr yemde denatüre edilmiş proteinlerdeki aminoasit miktarları(μ gr/10gr) %95 güvenirlilik sınırı ile verilmiştir.

örnek no	Deney sayısı	Trp	Tyr	Phe	protein mik.gr
1	5	191+13.6	516+27.2	833+68.2	0.74
2	5	175+23.6	675+23.6	541+68.2	1.18
3	5	62+12.2	766+12.2	750+118.3	0.96

Tablodan da görüleceği gibi; amino asit miktarlarının belirlenmesinde gerçek sapmaların düşük olması, yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Fenilalanin miktarlarındaki gerçek sapmaların, diğer amino asitlerden daha büyük olması ise; yemlerde bulunan miktarın 8:1:1 oranına uyum sağlamamasından ve elektronik devredeki gürültülerden geldiği söylenebilir.

Yemlerdeki aminoasitleri Uluslararası birim olan 100gr yemdeki miktar olarak gösterirsek;

Tablo.4.5.3 100 gram yemdeki aminoasit miktarları mg olarak verilmiştir.

örnek No	Tyr	Trp	Phe
1	5.16+0.272	1.91+0.136	8.33+ 0.682
2	6.75+0.236	1.75+0.236	5.41+ 0.682
3	7.66+0.122	0.62+0.122	7.50+ 0.118
Toplam	19.57+0.63	4.28+0.494	21.24+ 1.48

*

V. SONUÇ

Canlı organizma için gerekli temel amino asitlerden, triptofan ve fenilalanin belirlenmesi büyük bir önem kazanmaktadır. Çalışma konumuz olan triptofan, fenilalanin ve tirozin amino asitlerinin metabolizmalarını kısaca özetleyecek olursak; triptofan ,proteinlerin yapımında temel unsuru teşkil etmektedir. Ayrıca bitkilerin gelişmesi ve memelilerin beyin fonksiyonlarında triptofan metabolizmasındaki çeşitli metabolik ürünler önemli rol oynamaktadırlar. Fakat triptofanın, bir çok fonksiyonu henüz bilinmemektedir.

Tirozin temel olmayan amino asitlerin içerisinde yer almaktadır ve organizma tarafından kolaylıkla sentezlenebilmektedir. Tirozin, tiroid bezinin iç salgısı olan triksinin, adrenalın ve neropinefrin gibi hormonların ön maddesini teşkil eder.

Fenilalanin ise proteinlerin yapısındaki temel görevi yanında, tirozine dönüşmesi ve yıkım metabolizması sonunda meydana gelen metabolik ürünler organizmada önemli rol oynamaktadırlar.

Canlı organizma için gerekli olan bu amino asitlerin tayin edilmesi büyük önem kazanmaktadır. Bölüm .2.1 de amino asitlerin kantitatif analizi için uygulanan teknikler anlatılmıştı. Özellikle kalite kontrol amacıyla yapılan çalışmalarda hızlı ve pratik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntemler bu tür örneklerle uygulandığında birçok problemler ortaya çıkmaktadır. Bu problemleri

*

kısaca özetleyecek olursak; çok sayıdaki örneklerle çalışıldığından zaman açısından kullanışsız olması ve kimyasal madde tüketimi açısından da maliyetlerin yüksek olması, el becerisi ve hüner gerektirmeleri gibi örnekleri sıralayabiliriz.

İşte bu açıdan her laboratuvarında bulunabilen spektrofotometrelerin, türev devreleriyle donatılması halinde türev spektrumları analitik açıdan yeni ufuklar açmıştır.

Türev spektrofotometresi; moleküller tanımlama yanında, çoklu bileşen analizi ve hatta normal spektrum ile kalitatif analiz-in zor olduğu durumlarda dahi uygulama alanı bulmaktadır.

Diğer tekniklerde kullanılan çözücünün saf olması ve amino asitlerin çeşitli yöntemlerle fraksiyonlar halinde toplanması ve daha sonra analizlenmesi gerekmektedir. Halbuki Türev Spektrofotometresinde, örneklerin ön işlemsiz, direk olarak kantitatif analizi mümkündür.

Özellikle kalite kontrol gibi güncel konulardaki uygulamalarda oldukça pahalı olan bu yöntemlere alternatif olarak türev spektrofotometresi daha pratik ve ucuz yöntemdir. Bütün bunlara ek olarak türev spektrofotometresinin hızlı bir teknik olması ise büyük bir avantajdır. Örneğin HPLC de Phe ve Tyr amino asitlerinin analizlenmesi için 50-60 dakika, Amino Asit Analyzer ile 20-30 dakika gibi bir zaman gerekmesine karşın UV/VIS türev spektrofotometresi ile bir amino asitin kantitatif analizi,

*

spektrofotometrenin tarama hızına bağlı olarak 5-6 dakika gibi bir zaman almaktadır.

Sonuç olarak Türev Spektrofotometresinde; UV/VIS bölgede absorptans yapan veya bu bölgede aktif olarak absorplanmalarını sağlayarak çok bileşenli sistemlerin kalitatif ve kantitatif olarak analizlenmesi, birçok analitik problemlere çözüm getirebilmektedir. Günümüzde elektronikteki hızlı gelişmelere paralel olarak tekniğin de hızla gelişmesi; hızlı, ucuz ve pratik uygulamalara önemli ölçüde katkıda bulunacaktır.

ÖZET

Bu çalışmada; yemlerdeki proteinler, çözünürlüklerine göre çeşitli çözümlerle basit sınıflara ayrılmıştır. Basit sınıflara ayrılan bu proteinler üre ile muamele edildikten sonra, aromatik aminoasitler olan Fenilalanin(Phe), Triptofan(Trp) ve Tirozin(Tyr) nin tayinleri yapılmıştır. Aminoasit tayini için UV/VIS Türev Spektrofotometresi kullanılmıştır.

Fenilalanin(Phe) ve Triptofan(Trp) aminoasitlerinin 2.türev spektrumları pH 7 de, Tirozin(Tyr)'in 2.türev spektrumu ise pH 10 da alınmıştır. Basit proteinler olan; Albuminler, Histonlar, Protoaminler, Globulinler ve Glutelinler deki bu üç aminoasitin miktarları, standart katma methoduyla 2. türev spektrumları değerlendirilerek sonuca gidilmiştir.

SUMMARY

In this work, proteins in animal foods has been clasified according to their solubility in different solvents. There after Phenylalanine(Phe), Tryptophane(Trp) and Tyrosine(Tyr) amino acids has been determined by UV/VIS Spectrophotometer techniques after treatment with Urea.

Second derivative spectra of Phe and Trp amino acids has been recorded of pH 7 and of Tyr at pH 10. Amonts of the amino acids in Albumins, Histons, Protamins, Glutelins and Globulins which are basic proteins far living things has been determined by standart addition method. In these determinations second derivative spectra have been used for the interprotation of the results

*

K A Y N A K L A R

Kitaplar

- Emil.L, Smith.R.L, Hill.I, Abraham.W, "Principles of Biochemistry"
6, singapore, 1983
- Galen W.Ewing, "Instrumental Methods of Chemicals", 4 , New York
McGraw.Hill Book Company, 1975
- Henschen.A, Klaus-peter.H, Friedrich.L, "HPLC in Biochemistry"
Germany, 1985
- Kachmar.J, Dand Grand . H.G, M.A, (Edt.Norbert W . Tietz)
"Fundamentals of Clinical Chemistry", 2 , Canada , Saunders
Company, 1976
- Karagözler.E, "Spektroskopi Kış Okulu Ders Notları", Malatya,
Inönü Üniversitesi matb. 1986
- Lehninger.A.L, "Biochemistry", 2 , New York, 1970
- Perrin.D.D, Dempsey.B, Albert.A, "Buffers for pH and Metal Ion
Control", London, Chapman and Hall, 1974
- Willard.H, Merrit.L.L, Dean.J.A, Settle.T.B, "Instrumental Methods
of Analysis", 6, D.Van Nostrand Company Regional Offices
- Williams S. "Association Official Analytical Chemists", 4, USA, Official
Methods of Analysis, 1984

Makaleler

- Balestrieri.C, Colonna.G, Giovane.A, Irace.G and Servillo.L,
 "Second-Derivative Spectroscopy of Protein", Eur.J.Biochem,
 90,1978,433-440
- Concon.J.M, "Chemical Determination of Critical amino acids in
 Cereal Grains and Other Foodtuffs" Protein Nutritional
 Quality of Foods and Feeds,1975,18,311-381
- Friedman.M and Finley.J.W, "Evulation of Methods for Tryptofan
 Analaysis in Proteins" Protein Nutrutional Quality of
 Foods and Feeds, 1975,22,423-453
- Ichikawa.T, Terada.H,"Estimation of State and Amount of
 Fenylalaline Residues in Protein by Second Derivative
 Spectrophotometry",Biochimica et Biophysica Acta.580,1979,
 120-128
- Nuyken.O, Talsky.G, "Polymer Analysis by HODS", Polymer Bulletin,
 2,1980, 719-726
- Owen.T,"Advances in UV/VIS, Derivative Spectroscopy",
International Lab,58,64,1987
- önal.Y, özdemir.Y, Güçer.S,"Malatya ili Bentonitlerinin
 Aktifleştirilme Parametrelerinin UV/VIS-Türev Spektrofotometri
 ve X-Ray Diffraksiyon Yöntemi ile incelenmesi", VI.Ulusal
 Spektroskopi Kongresi, 22-26 Eylül 1987, Kayseri
- özdemir.Y, Güçer.S, "UV/VIS-Türev Spektrofotometresi ile Meyva

*

- Sularının Karakterize Edilmesi ve C Vitamini Analizleri",
IV. Kimya ve Kimya Müh. Sempozyumu, 5-7 Haziran
1987, Elazığ
- Richard.J.S, "Evaluation of Derivative Ultraviyole
Spectrophotometry for Saccharing in Cola and Other Matrices"
Anal.Chem. 4,63,1986
- Talsky.G, Mayring and Kreuzer.H, "High-Resolaton, Higher-Order
UV/VIS Derivative Spektrophotometry", Angewandte Chemie
17(11), 1978, 785-874
- Talsky.G, Gotz-Mahler.S, "High-Resolution, Higher-Order UV/VIS
Derivative Spektrophotometry in Mikrochemisty"
8th. International Microchemical Symposium, 1980
- Talsky.G, Götz-Mahler.S, Betz.H, "High-Resolution/Higher Order
Derivative Spektrophotometry in Microanalytical Chemistry"
Microchimica Acta(Wien), II, 1981a, 1-9
- Talsky.G, Tichy.S, "HODS for the Quantitative Determination of
Trp, Tyr and Phe in two and three Component Mixtures, Peptides
and Protein", Walter de Gruyter and Co, 1984. 95-102
- Talsky.G, Differentiation Höherer Zur Feinauflösung Von Spektren
und Anderen Elektrischen Signalen", Technisches Messen 48
6, 1981b
- Talsky.G, "HODS in Clinical Chemistry and Toxicologie",
Git.Lab.Med.6, 1983, 182-186
- Talsky.G, "UV-Derivative Spektrophotometrie Höherer Ordnung an

*

Azogruppenhaltigen Polycarbonaten", Makromol.Chem.
1979, 513-516

Talsky.G, Dostal.J, Glasbrenner.M, Götz-Mahler.S, "HODS for
Studying and Characterization of Protein and Other Native
Synthetic Macromolecules", Die Angewandte Makromolekulare
Chemie, 105, 1982, 49-59

Talsky.G, "HODS in Environmental Analytical Chemistry"
,Int.J.Envirn.Anal.Chem. 14, 1983, 81-91

*